

**Untersuchungen zur Aminosäurenverfügbar-
keit bei hitzegeschädigten Proteinen**

II. Erhitzung von Proteinen allein und mit Fetten

Gunther Weber

1972
—

Aus dem Institut für Tierphysiologie und dem Institut für
Ernährungsphysiologie der Universität München
Vorstände: Prof. DDr. DDr. h. c. Johannes Brüggemann
und Prof. Dr. Dr. Jürgen Tiews

Untersuchungen zur Aminosäurenverfügbarkeit bei hitzegeschädigten Proteinen

II. Erhitzung von Proteinen allein und mit Fetten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Gunther Weber
aus Püssensheim

München 1972

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

Dekan: Prof.Dr.J. Boessnek
Referent: Prof.DDr.DDr.h.c.Johs. Brüggemann
Korreferent: Prof.Dr.A. Mayr

Tag der Promotion: 11. 2. 1972



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. BESPRECHUNG DER LITERATUR	
I. Hitzeschädigung von Proteinen allein sowie in Anwesenheit von Fetten	3
II. Freie Aminosäuren im Pfortaderblut, Verwendung von alpha-Aminoisobuttersäure als inneren Standard	11
C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	
I. Untersuchungsmethoden	
1. Rohprotein- und Aminosäureanalysen	13
2. Peroxidzahl und Aldehydzahl	15
3. Versuch mit wachsenden Ratten	15
4. Bestimmung der Konzentration freier Aminosäuren im Pfortaderplasma	15
II. Ergebnisse	
1. Verwendung von alpha-Aminoisobuttersäure als Indikator zur Messung der Anflutung freier Aminosäuren im Pfortaderplasma (Versuch I)	19
2. Modellgemische aus Sojaprotein mit Sojaöl	
a. Erhitzung in einem Temperaturbereich von 85 - 176°C (Versuch IIa,b,c)	22
b. Erhitzung von Sojaprotein bei 162°C (Versuch III)	32
3. Modellgemische aus Casein mit Sojaöl	
a. Erhitzung bei 110°C (Versuch IV)	39
b. Erhitzung zusammen mit oxidiertem Sojaöl bei 112°C (Versuch V)	46
c. Autoklavierung von Casein zusammen mit oxidiertem und nicht oxidiertem Sojaöl (3 h bei 136°C) (Versuch VI)	51
III. Diskussion und Schlußfolgerungen	
1. Modellgemische	57
2. Untersuchungsverfahren	57
3. Ergebnisse	62
D. ZUSAMMENFASSUNG	69
E. LITERATURVERZEICHNIS	72
LEBENS LAUF	88

A. EINLEITUNG

Auf die Anwendung hoher Temperaturen bei der Herstellung und Zubereitung von Nahrungs- und Futtermitteln kann man aus wirtschaftlich-technischen, hygienischen und zum Teil ernährungsphysiologischen Gründen nicht verzichten. So werden z. B. Eiweißfuttermittel tierischer Herkunft durch Kochen und Autoklavieren aufbereitet und anschließend im heißen Luftstrom getrocknet. Fast alle Eiweißfuttermittel aus Pflanzen unterliegen etwa bei der Fettextraktion oder zur Verbesserung des Futterwertes einer Hitzebehandlung. Aber auch beim Grundfutter wie beim Getreide oder beim Trockengrünfutter ist vielfach eine künstliche Trocknung unter Anwendung von Hitze notwendig.

Bei allen diesen hitzebehandelten Futtermitteln kann der Eiweißanteil während der Erhitzung Veränderungen außerordentlich komplexer Natur erfahren. Diese Veränderungen im Futterprotein können in vielen Fällen eine Schädigung zur Folge haben, die auch den ernährungsphysiologischen Wert des Produkts erheblich beeinträchtigt. Die Proteinschädigung selbst ist aufgrund des komplizierten und variierenden Aufbaus der Proteine und der verschiedenartigen übrigen Bestandteile des Futters, sowie wegen der unterschiedlichen Erhitzungsverfahren nur schwer zu definieren und zu beurteilen.

In vielen Fällen ist die ernährungsphysiologische Minderung der Proteinqualität durch Hitzebehandlung nicht gleichbedeutend mit einer totalen Zerstörung der Aminosäuren. Häufig kommt es nur zu einer Inaktivierung verschiedener Aminosäuren, die chemisch-analytisch nur unzureichend nachweisbar ist. Für den Organismus sind diese Aminosäuren nicht verfügbar, d. h. sie können weder energetisch verwertet werden noch sind sie für die Proteinsynthese ausnutzbar.

In der vorliegenden Arbeit sollte festgestellt werden, welche physiologischen Konsequenzen sich aus der Erhitzung von Proteinen allein sowie zusammen mit Fett und oxydierten Fetten ergeben.

B. BESPRECHUNG DER LITERATUR

I. Hitzeschädigung von Proteinen allein und in Anwesenheit von Fetten

Die Folgen einer Erhitzung von Eiweiß sind je nach Temperaturhöhe und Zeitdauer sowie besonders in Abhängigkeit von der Futterzusammensetzung unterschiedlich.

Mäßiges Erhitzen verbessert in vielen Fällen den Nährwert. Die vor allem in Leguminosen enthaltenen Trypsininhibitoren sowie manche andere Wachstumsverzögernde, manchmal sogar toxische Faktoren werden bei Temperaturen um 100°C inaktiviert. Auch die besonders bei längerer Lagerung zur Wirkung kommenden Enzyme (Lipoxidasen und Diastasen) sind hitzestabil (2, 40, 65, 74). Die Verbesserung der Schmackhaftigkeit durch Kochen, Braten u. a. ist aus der Ernährung des Menschen bekannt. Auch beim Tier spielen sie eine Rolle. So konnten z. B. MILNER und CARPENTER (84) durch Kochen von Weizen in Wasser eine Wachstumssteigerung bei Ratten erzielen. Schließlich wird die Angriffsmöglichkeit für Proteasen durch Strukturveränderungen am Eiweiß (Hitzedenaturierung) verbessert.

Die kritische Temperatur, von der ab es zu einer Minderung der Proteinqualität kommt, liegt bei 100-120°C. So erfährt nach GREAVES (49) Casein in Abwesenheit von Kohlenhydraten und Fetten erst ab 120°C eine nachweisbare Schädigung. DÜMMER konnte jedoch in Versuchen mit Ratten zeigen, daß es während der Trocknung von Casein bei 105-110°C schon zu einer beträchtlichen Verminderung der relativen Aminosäurenverfügbarkeit kommt (34). Auch Autoklavieren von Casein bei 138°C für nur 30 Minuten beeinträchtigte die Aminosäurenverfügbarkeit. Nach MENDEN wird die enzymatische Hydrolyse des Proteins in vitro mit Pankreatin durch dreistündiges Trocknen von Casein bei 140°C vermindert.

Anderen Autoren dienten Sojaschrot, Fischprodukte oder auch Rinderplasmaalbumin als Modelle, um den Verlauf und das Ausmaß der Proteinschädigungen zu untersuchen. Als Kriterium hierfür wählten sie zumeist die Proteinverdaulichkeit und die Gewichtszunahmen wachsender Tiere (6, 113), weiterhin die Verminderung der Aminosäurenkonzentration im peripheren Blut bei Kühen (81, 131, 132) oder im Pfortaderblut bei Ratten (51) und schließlich den Gehalt an verfügbarem Lysin (z. B. 22, 38, 66).

Ursache der Qualitätsminderung ist zum Teil eine direkte Aminosäurenzerstörung. Als besonders empfindlich gegenüber

thermischen Einflüssen gilt das Cystin. Dreißigminütiges Toasten von Sojaschrot bei 100-110°C führte zur Freisetzung von Schwefelwasserstoff (1). Weitere Zersetzungsprodukte wie Methylmercaptan, Dimethylsulfid und Dimethyldisulfid fanden BJARNASON und CARPENTER beim Erhitzen von Rinderplasmaalbumin (7). Sie nehmen an, daß neben einer totalen Zerstörung des Cystins durch Sprengung der -C-C-Bindungen auch eine hydrolytische Spaltung der Disulfidbrücken auftritt. Hierbei wird aus dem Cystin ein Cysteinmolekül freigesetzt, während der Rest in H_2S und einen noch nicht näher definierten Aldehyd zerfällt. In Peptidketten können Asparagin und Asparaginsäure während einer Behandlung mit kochendem Wasser alpha-Aminosuccinimidderivate bilden, die nach Decarboxylierung zu einem bestimmten Anteil Alanin ergeben (112). Die basischen Aminosäuren werden ebenfalls leichter zerstört, während die hier nicht genannten Aminosäuren weniger labil zu sein scheinen.

Die aus der direkten Aminosäurenzerstörung resultierenden Verluste können analytisch erfaßt werden. Sie bieten jedoch allein noch keine befriedigende Erklärung für die insgesamt beobachteten Nährwertverluste. Als weitere Ursachen nimmt man daher an, daß neben der totalen Aminosäurenzerstörung auch eine Inaktivierung der Aminosäuren auftritt. Diese Inaktivierung soll durch Reaktion funktioneller Gruppen im Protein mit verschiedenen Bestandteilen des Futters zustande kommen.

Die Umsetzungen der Proteine mit reduzierenden Zuckern (Maillard-Reaktion) sind zumindest im Initialstadium weitgehend bekannt, sie sollen an dieser Stelle nicht besprochen werden (s. 34, 37, 59). Weniger geklärt sind die Verhältnisse der Aminosäureninaktivierung bei Erhitzung von Proteinen allein. Hier scheinen inter- und intramolekulare Bindungen aufzutreten, die von den Enzymen des Verdauungstraktes nicht mehr angegriffen, durch die Säurehydrolyse aber gespalten werden können. Hierbei treten

wahrscheinlich Esterbindungen z. B. zwischen funktionellen Carboxylgruppen und der Hydroxylgruppe von Threonin und Serin auf. Außerdem werden Thioesterbindungen wie etwa zwischen Cystein und den Monoaminodicarbonsäuren oder Imidbindungen zwischen Glutaminsäure und Glutamin für möglich gehalten. In der Natur sind sie u. a. im Kollagen und bei Mikroorganismen zu finden. Sie werden durch die Verdauungsenzyme nicht gespalten, sind aber hydrolyselabil (80).

Wie in der bereits erwähnten Maillardreaktion (Umsetzung von Proteinen und Aminosäuren mit Kohlenhydraten s. auch HEYNS, 59) kommt auch hier der freien epsilon-Aminogruppe des Lysins eine entscheidende Rolle für diese Kondensation innerhalb von Proteinen zu. ELDRED (35) und BLOCK (8) stellten als Folge einer Hitzebehandlung Peptidbindungen zwischen der epsilon-Aminogruppe des Lysins und freien Carboxylgruppen der Aminodicarbonsäuren fest. Diese in der Folgezeit oftmals für eine verminderte Verfügbarkeit des Lysins verantwortlich gemachte Reaktion (6, 22, 42, 82, 130) würde im Falle einer Beteiligung der Glutaminsäure zu epsilon-gamma-Glutamyl-Lysin führen.

Nach neueren Untersuchungen von BJARNASON und CARPENTER (7) wird dieses Glutamyl-Lysin unter Ammoniakabspaltung durch Kondensation der epsilon-Aminogruppe des Lysins mit der Amidgruppe des Glutamins gebildet. Weiterhin sind nach diesen Autoren die bei der Cystinzerstörung entstandenen Produkte für eine Weiterreaktion mit dem Lysin verantwortlich. DE GROOT und SLUMP (30) konnten in diesem Zusammenhang zeigen, daß durch Alkalibehandlung von Sojaprotein sich die Cystin- und Serinreste zu Dehydroalaninresten umformen lassen. Diese wiederum vermögen mit der epsilon-Aminogruppe des Lysins eine Bindung einzugehen (Lysinoalanin) oder in Anwesenheit von intakten Cystinresten sich zum Lanthionin zusammenzulagern (62).

Bei der Erhitzung von Proteinen allein können somit die auftretenden Schädigungen der Aminosäuren Lysin, Threonin, Cystein, Serin, Asparaginsäure und Glutaminsäure (samt ihren Amidene) durch diese Reaktionen erklärt werden.

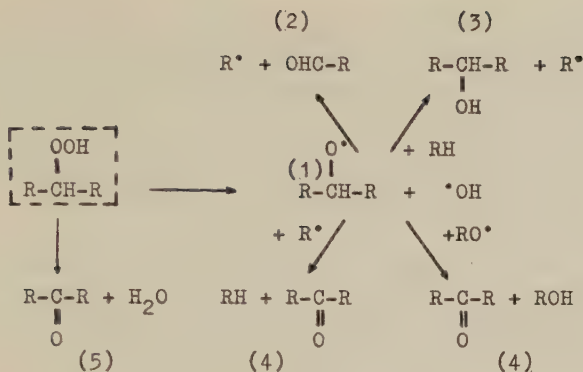
Der Fettanteil der Nahrungs- und Futtermittel kann besonders bei längerer Lagerung vielfache Veränderungen erleiden. Nachfolgend werden einige Umsetzungen aufgeführt, deren Zwischen- und Endprodukte Reaktionspartner für Aminosäuren und Proteine sein können.

In Gegenwart von Wasser und bei höheren Temperaturen werden leicht Fettsäuren aus dem Glyceridverband freigesetzt. Besonders beschleunigt wird der Fettabbau durch die Anwesenheit hydrolytischer Enzyme, wie sie in manchen Futtermitteln vorkommen oder von entsprechenden Mikroorganismen erzeugt werden können.

Die Fähigkeit von Fetten und Ölen, spontan und ohne Zusatz von anderen Substanzen mit Luftsauerstoff zu reagieren, wird Autoxidation genannt. Der Sauerstoff wird im allgemeinen einem Kohlenwasserstoff in Nachbarstellung zur Doppelbindung angelagert, sodaß vor allem die ungesättigten Fettsäuren gefährdet sind. Der Mechanismus der Fett-oxidation soll hier im Einzelnen nicht diskutiert werden. Es sei hierzu auf verschiedene zusammenfassende Arbeiten (z.B. 69, 77, 101, 117) verwiesen. Im Folgenden werden nur die für das Verständnis der Arbeit wichtigen Umsetzungen beschrieben.

Bei der Bildung von Hydroperoxiden wird in einem ersten Schritt unter Energiezufuhr (z.B. Licht, Wärme) die schwächste, in alpha-Stellung zu einer Doppelbindung gelegene C-H-Bindung gespalten. An dieses Fettsäureradikal wird Sauerstoff angelagert. Das in dieser Weise entstandene Peroxidradikal vermag der Methylengruppe eines weiteren Fettsäuremoleküls ein H-Atom zu entreißen, was einerseits zu einem analytisch erfaßbarem Hydroperoxid führt und außerdem ein neues Radikal entstehen läßt. Letzteres ergibt durch erneute Sauerstoffaufnahme wieder ein Peroxidradikal. Bei Anwesenheit weiterer ungesättigter Fettsäuren wird dadurch eine Kettenreaktion in Gang gehalten (Autoxidation = autokatalytische Oxidation).

Die während der ersten Stufe der Autoxidation gebildeten Hydroperoxide sind nicht beständig. Nach ihrer Zersetzung zu freien Alkoxy- und Hydroxyradikalen (s. Formelschema unter 1) können neben Aldehyden (2) durch Abspaltung eines H-Atoms aus einem anderen Molekül ein sekundärer Alkohol und ein neues freies Radikal entstehen (3). Ketone werden durch Wechselwirkung von zwei freien Radikalen unter Abbruch der Reaktionskette (4) oder bei Temperaturerhöhung und in Anwesenheit von Alkalien aus Hydroperoxiden direkt (5) erhalten. (60)



Als Folge einer Reaktion zwischen Hydroperoxiden bzw. deren Radikalen mit ungesättigten Kohlenwasserstoffverbindungen konnten Epoxide nachgewiesen werden (96, 97).

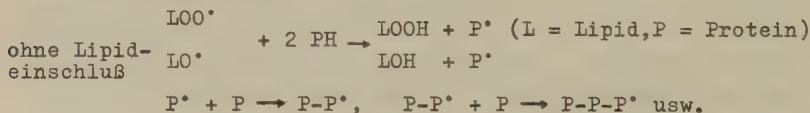
Zusätzliche Veränderungen treten unter dem Einfluß höherer Temperaturen auf. Wenn wenigstens ein Teil der ungesättigten Fettsäuren in konjugierter Form vorliegt, dann kommt es nach thermischer, oxidativer oder katalytischer Isomerisierung zur "thermischen Polymerisation" der Fette. Als Oxypolymere werden die Produkte der sogenannten thermischen Oxidation bezeichnet. Auch hier tritt als Vorstufe der Kondensation immer eine Autoxidation auf, deren Primär- und Sekundärprodukte mehr oder weniger zur Oxypolymerenbildung neigen. Die Molekülverknüpfung erfolgt hierbei im wesentlichen über -O-O- oder -O-Brücken (71, 101).

Nach CARPENTER (19) können oxidative Veränderungen den Nährwert auf verschiedene Weise beeinträchtigen. Ein hoher Gehalt des Futters an oxidierten Fetten kann direkt toxisch wirken (Veränderungen an biologischen Membranen s. 4, 20). Oxidierte Fette mindern außerdem die geschmackliche Qualität und setzen damit den Appetit herab. Weiterhin kann es durch oxidative Vitaminzerstörung oder durch eine Erhöhung des Vitaminbedarfs zu einer Mangelsituation insbesondere an Vitamin E kommen. Schließlich treten unter der Einwirkung oxidativ veränderter Fette Proteinschädigungen auf, wenn sich das Protein mit den entsprechend veränderten Fetten umsetzt (72, 73, 108).

In Modellversuchen fand TAPPEL (135, 136), daß die Anwesenheit der großen Proteinmoleküle (Casein, Hämoglobin) zu einer Oberflächenkatalyse während der Oxidation von Öl führt. Die gebildeten sekundären Oxidationsprodukte, wahrscheinlich zumeist Aldehyde, gehen mit Proteinen und Aminosäuren eine typische Aldehyd-Amin-Bräunungsreaktion ein. Copolymere, bekannt als Melanoidine, stellen das Endprodukt dar (Copolymerisationstheorie). Phenolische Antioxidantien und Tocopherole hemmen diesen Vorgang. Die Fähigkeit zur Copolymerenbildung nimmt in der Reihenfolge Protein - Peptide - Aminosäuren ab.

Anzeichen für das Vorhandensein derartiger Kondensationsprodukte sind eine Verminderung der Löslichkeit für die einzelnen Reaktionspartner und der Spaltbarkeit des Proteins durch Papain. Außerdem treten scheinbare Verluste an Aminostickstoff auf, die man über die Umwandlung von Aminosäuren in andere Stickstoffverbindungen und die unvollständige Hydrolysierbarkeit der Kondensationsprodukte erklären kann. Dieselben Reaktionen werden von TAPPEL (137) für eine Verschlechterung der Qualität von gefriergetrocknetem Rindfleisch während der Lagerung verantwortlich gemacht. Durch später erhaltene Befunde (z. B. aus Untersuchungen mit oxidiertem Sardinenöl, das mit Eialbumin emulgiert wurde) wird jedoch die Bedeutung der Aldehyd-Amin-Reaktion eingeschränkt (143). So wurde die Bräunung durch Acetylierung der freien Aminogruppen des Proteins und durch Zugabe von Schwefeldioxid (einem Inhibitor der Aldehyd-Amin-Reaktion) eher erhöht als erniedrigt. Offensichtlich waren in den entsprechenden Versuchen die Temperaturen für das Entstehen der Aldehyd-Amin-Reaktion zu niedrig.

Nach neueren Arbeiten von TAPPEL und Mitarbeitern (115) führen daher freie Radikale, die als Zwischenprodukte der Fettoxidation entstehen, zur Quervernetzung von Peptidketten, wobei entsprechende Oxidationsprodukte nicht immer eingeschlossen sein müssen. Das folgende Schema zeigt den Ablauf der Reaktionen:



unter Lipid-
peroxid-
einschluß

POOLOOP = Dimeres Protein
POOLOOPPOOLOOP = Trimeres Protein

NARAYAN und KUMMEROW haben in Untersuchungen an einem Komplex aus autoxidierter Linolensäure mit Eialbumin festgestellt, daß diese Kondensation nicht durch Covalentbindungen, sondern durch multiple Wasserstoffbrücken zustande gekommen sein muß. Sie fanden (90) eine Abhängigkeit der Komplexbildungsfähigkeit vom Denaturierungsgrad des Eiweißes

(vergrößerte Oberfläche). Optimale Reaktionsbedingungen lagen bei einer 1%-igen Proteinlösung im neutralen Milieu und 60°C vor. Weiterhin wurde die Bindung von thermisch polymerisierten und thermisch oxidierten Pflanzenölen an Eialbumin verfolgt (91). Hierbei wurden folgende Ergebnisse erhalten:

1. Nur oxidierte oder polymerisierte Fettsäuren können mit Eialbumin Komplexe bilden, wobei oxidierte Öle eine größere Bereitschaft zur Kondensation zeigen als polymerisierte. Mit zunehmender Oxidation nimmt die Komplexmenge zu.
2. Für die Entstehung der Komplexe sind Epoxide und Aldehyde, in weitaus größerem Maße aber Carbonylverbindungen verantwortlich zu machen; Peroxide allein erweisen sich als unwirksam.
3. Die Bindung der oxidierten Lipide am Protein erfolgt vermutlich nicht elektrostatisch oder durch Adsorption mit Hilfe polarer oder unpolarer Van der Waalscher Kräfte, wie sie in Lipoproteinen vorkommen (5, 141). Wahrscheinlich treten Wasserstoffbrücken auf, und zwar zwischen der Carbonylgruppe des Fettes und der Aminogruppe des Proteins oder auch zwischen dem Carbonylsauerstoff des Proteins und der Hydroxy- (Hydroperoxy-)gruppe des oxidierten Fettes. Obwohl einzelne Bindungen dieser Art verhältnismäßig schwach sind, ist ihre kumulative Wirkung genügend groß.

Resultate von POKORNY (105, 106, 107, 109) aus Versuchen mit Polyamid, Albumin und Casein auf der einen Seite und oxidiertem Öl, Epoxystearinsäuren, Hydroxyketostearinsäuren samt ihren Methylestern andererseits, unterstützen diese Theorie der Wasserstoffbrücken.

Die Lipid-Proteinkomplexe zeichnen sich durch eine Abnahme der, z. B. nach der Ionenaustauschchromatographie, Gel-elektrophorese und Fettextraktion, trennbaren Komponenten aus. Das Molekulargewicht ist erhöht. Ferner ist eine Verminderung der mit Dinitrofluorbenzol erfaßbaren Lysinreste festzustellen. Die Verbindungen sind resistent gegen den Angriff verschiedener Enzyme. Während der Entstehung der Komplexe kommt es zu einer Aufnahme von Sauerstoff und zu einer Zunahme der Bräunungsintensität (23, 89, 105, 121, 122). Die physiologische Bedeutung der Umsetzungen wird im Zusammenhang mit den Ergebnissen der eigenen Untersuchungen später diskutiert.

Carbonylverbindungen sind nach der übereinstimmenden Ansicht der meisten Autoren ursächlich an der Komplexbildung beteiligt, wenn auch eine Vielzahl von Reaktionswegen postuliert wird. So führen nach SCHORMÜLLER die Carbonylverbindungen (121, 122) zu einer Quervernetzung einzelner Peptidketten und einer zusätzlichen Blockierung der epsilon-Amino-Gruppe des Lysins (nachgewiesen durch Reaktion mit DNFB). Über ähnliche Ergebnisse berichteten bereits LEA (72, 73) anlässlich der Qualitätsbeurteilung von Fisch-

mehlen, sowie ANDREWS und Mitarb. (3), als sie die Autoxidationsprodukte von Methyllinoleat-Gelatine und Methyllinoleat-Insulin untersuchten. In der letztgenannten Arbeit haben auch die N-terminalen Aminosäuren des Insulins (Glycin und Phenylalanin) reagiert. Weiterhin war es zu einer Quervernetzung des Proteins mit dem Methyllinoleat gekommen.

Neben dem Lysin erleiden vor allem die schwefelhaltigen Aminosäuren Veränderungen: Cystein kann verhältnismäßig leicht zum Disulfid Cystin oxidiert werden. Schwieriger ist die Umwandlung zum Cysteindisulfid und dann zur Cysteinsäure. Diese wiederum sind zur Sulfin- und Sulfonsäure hydrolysierbar. Methionin kann zum Sulfoxid und zum Sulfon oxidiert werden. Bedingt durch die Anwesenheit oxidierender Fette wurden von diesen Verbindungen bisher Cystin, Cysteindisulfid, Cysteinsäure und Methioninsulfoxid nachgewiesen (9, 17, 50, 72, 75, 115, 134, 144).

II. Freie Aminosäuren in der Pfortader. Verwendung von alpha-Aminoisobuttersäure als inneren Standard

Nach ihrer Passage durch die Darmwand gelangen die Aminosäuren mit dem Blut an die Orte, an denen sie entweder zur Proteinsynthese dienen oder energetisch verwertet werden. Die Stelle im Blutkreislauf, die am besten zur Blutentnahme geeignet ist, ergibt sich unter anderem aus dem Versuchsziel. Für Untersuchungen über die Vorgänge der Verdauung und der Resorption und teilweise auch zur Qualitätsbeurteilung von Proteinen ist es vorteilhaft, Proben aus dem vom Verdauungstrakt kommenden Blut - Mesenterialvenen oder Pfortader - zu gewinnen (31, 32, 34, 39, 40, 48, 51, 103, 104).

Die Aminosäurenanflutung in der Pfortader wird durch den Mahlzeitenrhythmus, die Menge und den Proteingehalt des Futters, die Geschwindigkeit der Magen-Darmpassage, die Aktivität der Verdauungsenzyme und die Resorptionsleistung der Darmschleimhaut beeinflusst. Daneben wirken sich der Aminosäurenbedarf für die Proteinsynthese, die Fließrate des Blutes in der Pfortader, die Transformation einzelner Aminosäuren in der Darmwand und nicht zuletzt Menge und Art des endogenen Proteins auf die Konzentration der freien Aminosäuren aus (38, 45, 47, 76, 79, 92, 93, 94, 95).

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, um diese Einflüsse zu berücksichtigen oder auszuschalten. Eine ungleichmäßige Futteraufnahme kann durch Verwendung einer Magensonde oder durch entsprechendes Training der Tiere verhindert werden (48, 78, 99). Durch Feststellung des Trockensubstanzgehalts im Magen und im Dünndarm sind Rückschlüsse auf die Geschwindigkeit der Magen-Darmpassage möglich. Die Bestimmung der löslichen und unlöslichen Stickstoffverbindungen im Dünndarm erlauben Hinweise auf die Aktivität der proteolytischen Enzyme (13, 14, 16). Eine Blockierung des Aminosäuretransports in der Darmwand läßt sich aus einem Vergleich der resorbierten Aminosäuremenge in der Pfortader mit den löslichen Stickstoffverbindungen im Darm erkennen. Der Bedarf an Aminosäuren für die Proteinsynthese kann durch Verwendung langsam wachsender oder erwachsener Tiere sowie durch eine ausgewogene Diät während der Anpassungszeit und durch strenge Einhaltung der Fütterungszeiten konstant gehalten werden. Der Einfluß des endogenen Proteins auf die Konzentration freier Aminosäuren im Pfortaderblut wird durch Verabreichung einer Hochprotein-diät als Anpassungs- und Versuchsfutter zumindest eingeschränkt. Neuere Untersuchungen (120) zeigen, daß außerdem durch eine derartige proteinreiche Fütterung eine adaptive Erhöhung der Verdauungs- und Resorptionskapazität im Verdauungstrakt eintritt.

Eine weitere Möglichkeit der Standardisierung ist die Zugabe von alpha-Aminoisobuttersäure (AIBA) als Indikator für die Aminosäurenresorption. In der Natur wurde AIBA im Hydrolysat eines Antibiotikums aus einem Paecilomycesstamm nachgewiesen (68). Eine neuere Notiz von HARRISON et al. (58), wonach AIBA auch im Dünndarm bei Schafen gefunden wurde, läßt vermuten, daß auch Mikroorganismen im Verdauungstrakt befähigt sind, diese Verbindung zu synthetisieren. Die leicht synthetisierbare Verbindung diene bisher vor allem als Modellaminosäure zur Erforschung des Aminosäuretransports im Gewebe.

Sie besitzt den wesentlichen Vorzug, daß sie im Stoffwechsel nicht umgesetzt wird (24, 25, 123). Studien an Ehrlich-Aszites-Tumorzellen ließen eine Transportbeeinflussung anderer Aminosäuren unwahrscheinlich erscheinen. Nach Untersuchungen von JERVI und SMYTH mit der "everted sac"-Technik wird AIBA durch die Darmwand aktiv transportiert (67). An Ratten und Hunden konnten CHRISTENSEN und Mitarbeiter (24) nachweisen, daß AIBA vom Körper über die Niere ausgeschieden wird. Fünf Stunden nach interperitonealer Injektion waren 30 % und weitere 25 Stunden später 80 % der ursprünglichen Dosis im Harn erschienen. SMITH (128) verwendete bereits 1966 AIBA als "internal indicator" bei Küken. Beim Geflügel wirkt sich jedoch die Applikation von alpha-Aminoisobuttersäure nachteilig auf den Argininstoffwechsel aus. Durch Zusatz von 0.5 % AIBA zu einer Caseindiät wurde die Arginaseaktivität in der Niere erniedrigt; es kam zu einer Anhäufung von freiem Arginin sowohl im Blutplasma als auch im Muskel. Wie Untersuchungen an Ratten zeigten, gilt diese jedoch nur für die Verhältnisse beim Geflügel (139).

Zusammen mit einem Teil der schon vorher besprochenen Maßnahmen kann man insgesamt vom Einsatz der alpha-Aminoisobuttersäure im Rahmen der Pfortadertechnik bei der Ratte Aufschlüsse über die Resorption der Aminosäuren aus dem Darm und über die Fließrate des Blutes erwarten.

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

In der vorliegenden Arbeit wird über Untersuchungen an Modellgemischen aus isoliertem Sojaprotein bzw. Säurecasein und Sojaöl berichtet. Die Mischungen wurden verschieden hohen Temperaturen zusammen mit unbehandeltem oder mit oxidiertem Sojaöl ausgesetzt.

Als Hauptkriterium für eine veränderte Aminosäurenverfügbarkeit dienten die Konzentrationsunterschiede der freien Aminosäuren im Pfortaderplasma nach einer Testmahlzeit der entsprechenden Proteine an hochproteinadaptierte, erwachsene Ratten. Weiterhin wurde die Entwicklung wachsender Ratten als Maß für die Proteinqualität der hitzebehandelten Proteine herangezogen. An allen Proteinen wurden Aminosäureanalysen nach salzsaurer Hydrolyse durchgeführt und der Gehalt an verfügbarem Lysin nach der Dinetrofluorbenzolzolmethode bestimmt.

Gleichzeitig sollte die Brauchbarkeit der alpha-Aminoisobuttersäure (AIBA) als innerer Standard im Rahmen der Pfortadertechnik untersucht werden.

I. Untersuchungsmethoden

1. Rohprotein- und Aminosäureanalysen

Der Rohproteingehalt wurde nach Kjeldahl (Makroverfahren) bei Einwaagen von 1 - 2 g des Untersuchungsgutes (lufttrockenes Material)⁺ bestimmt. Zur Berechnung des Eiweißgehaltes wurde stets der Faktor 6.25 verwendet.

Der Aminosäuregehalt wurde nach salzsaurer Hydrolyse ionenaustauschchromatographisch (SPACKMAN, STEIN und MOORE) wie folgt ermittelt:

⁺Es empfiehlt sich, gleichzeitig mit der Einwaage zur Aminosäurenbestimmung eine Rohprotein- oder Wasserbestimmung durchzuführen. Dadurch können Fehler durch Schwankungen im Wassergehalt des Untersuchungsmaterials vermieden werden.

Dazu wurden - analytisch gewogen - etwa 500 mg des fein gemahlenden, lufttrockenen Untersuchungsmaterials in 800 ml 6N-Salzsäure unter Stickstoff 24 Stunden bei Siedetemperatur hydrolysiert. Anschließend wurde das Hydrolysat abgekühlt, mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt und filtriert. Davon wurden 100 ml nach Zugabe eines inneren Standards (Norleucin) im Vakuumrotationsverdampfer bei maximal 60°C auf 20 - 30 ml eingengt und schließlich in 100 ml Citratpuffer pH 2.2 aufgenommen.

1 ml dieses analysenfertigen Proteinhydrolysates (angestrebter Gesamtaminosäuregehalt 1.5 - 2.5 mg) wurden mit Hilfe einer automatischen Apparatur zur Kurzzeitchromatographie untersucht. Die sauren und neutralen Aminosäuren wurden an einer 60 cm langen, im Innendurchmesser 9 mm starken Ionenaustauschersäule (Kationenaustauscher: Bio-Rad Aminex A 4) bei 50°C Reaktionstemperatur aufgetrennt. Bis zur Elution des Alanins erfolgte die Auftrennung mit einem Citratpuffer pH 3.24, während Valin bis einschließlich Phenylalanin mit einem Citratpuffer pH 4.30 eluiert wurde. Zur Bestimmung der basischen Aminosäuren und des Ammoniaks dienten eine 15 cm lange Säule, eine Reaktionstemperatur für den Ionenaustausch von 55°C und ein Citratpuffer mit pH 5.30.

Das aus beiden Säulen bei einer Durchflußgeschwindigkeit von zumeist 80 ml/h austretende Eluat wurde mit Ninhydrinreagenz im Verhältnis 2:1 vermischt und anschließend in einem kalibrierten Teflonschlauch auf 100°C erhitzt. Die Extinktion des sich hierbei entwickelnden blauvioletten Farbkomplexes aus dem Ninhydrin mit der Aminogruppe der entsprechenden Aminosäure wurde mit einem Durchflußcolorimeter bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen. Die Extinktion der sich bei der Reaktion des Prolins mit dem Ninhydrin bildenden rötlich-gelben Farbe wurde mit einem zweiten Durchflußcolorimeter bei einer Wellenlänge von 440 nm gemessen. Die Impulse der beiden Colorimeter wurden von einem Zweipunktschreiber aufgezeichnet.

Cystin wurde durch 16-stündige Oxidation des Untersuchungsgutes mit Perameisensäure in Cysteinsäure umgewandelt, die nach Hydrolyse mit 6N Salzsäure ebenfalls mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie quantitativ bestimmt wurde. Die Bestimmung des verfügbaren Lysins erfolgte nach der Dinitrofluorbenzolmethode in einem etwas modifiziertem und vereinfachtem Verfahren nach CARPENTER (18). Nähere Einzelheiten sind aus den Arbeiten von ERBERSDOBLER ersichtlich (37, 38, 41).

* Modell BC 200 der Firma Bio-Cal, München

2. Peroxidzahl und Aldehydzahl

Der peroxidisch gebundene Sauerstoff (sogenannte Peroxidzahl) wurde nach dem Verfahren von D. H. WHEELER (zit.n. 33) erfaßt. Die Peroxidzahl ist hierbei als die in 1 kg Fett enthaltenen Milliäquivalente Sauerstoff definiert.

Die Aldehyd- bzw. Benzidinzahl ist definiert als die Menge Zimtaldehyd in mg pro 1 g Fett, die nach einem auf der Basis der Arbeiten von HOLM et. al. (61) durch die JUPAC standardisierten Analysenverfahren bestimmbar ist (64). Benzidin ergibt mit den als Sekundärprodukten der Autoxidation (s.S. 6) entstehenden gesättigten und ungesättigten Aldehyden eine Farbreaktion. Zusammen mit der Peroxidzahl ist die Aldehydzahl das wichtigste Kriterium zum Nachweis des oxidativen Fettverderbs.

3. Versuche mit wachsenden Ratten

Der Fütterungsversuch mit 3 - 4 Wochen alten, wachsenden männlichen Albinoratten wurde nach den Richtlinien des Arbeitskreises für Proteinebewertung der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie der Haustiere (46) durchgeführt. Nach einer Vorperiode von 4 Tagen, in der die Ratten ein Futter ähnlicher Zusammensetzung wie die Versuchsrationen erhielten, wurden gewichtsgleiche Gruppen zu je 10 Tieren (2 Tiere pro Käfig) gebildet. Futter und Wasser konnten ad libitum aufgenommen werden. 7, 14 und 18 Tage nach Beginn des Versuchs wurden die Ratten im Anschluß an 6-stündiges Fasten gewogen und der Futterverzehr festgestellt. Versuchs-kriterien waren Gewichtszunahme, Futterverwertung (g Futteraufnahme pro g Körpergewichtszunahme) und die Protein Efficiency Ratio ($PER = \frac{\text{g Körpergewichtszunahme}}{\text{g Proteinaufnahme}}$). Bei den statistischen Berechnungen wurde der Mittelwert für 2 Tiere pro Käfig als Einzelwert herangezogen.

4. Bestimmung der Konzentration freier Aminosäuren im Pfortaderplasma.

In einer 14-tägigen Anpassungszeit erhielten 170 - 270 g schwere weibliche Albinoratten (Einzelhaltung) eine Vor- diät ähnlicher Zusammensetzung wie die Probemahlzeit. Während der letzten 7 Tage dieser Vorperiode wurden die Tiere darauf trainiert, ihr Futter zweimal am Tag, und zwar morgens innerhalb von 30 min bzw. zur Abendmahlzeit während einer Stunde aufzunehmen. Danach wurden annähernd gewichtsgleiche Gruppen mit je 4 oder 5 Ratten gebildet.

Nach 24-stündigem Fasten erhielten die Tiere mit Ausnahme der zur Bestimmung des Nüchternwertes vorgesehenen Ratten 2 g der entsprechenden Versuchsration pünktlich zur Morgenmahlzeit. Die Zusammensetzung der verschiedenen Futtermischungen ist aus Tabelle 1 ersichtlich. Die Testmahlzeit wurde zumeist spontan verzehrt. Nur bei Versuch III verweigerten die Tiere die Aufnahme des stark hitzebehandelten Sojaproteins. Daraufhin erhielten alle Tiere in einer nochmaligen Trainingsperiode von 7 Tagen die Vor- und ProbEDIäten mit einem Zusatz von 0.15 % Sacharin (118) als Geschmackskorrigens. In der Folge wurden die stark überhitzten ProbEDIäten ebenso schnell verzehrt wie die weniger stark erhitzten Chargen.

Nach entsprechenden Zeitintervallen zwischen der Testmahlzeit und der Blutentnahme wurden den Tieren jeder Gruppe in Äthernarkose die Bauchhöhlen eröffnet und jeweils 4 - 5 ml Blut aus der Pfortader entnommen.

Die Blutproben der 4 bzw. 5 Ratten pro Gruppe wurden mit Heparin als Antikoagulans versetzt, vereinigt und im Eisbad gekühlt. Zur Plasmagewinnung wurde das Blut 15 min bei 3000 Umdrehungen pro min zentrifugiert. 5 ml Plasma wurden mit 25 ml einer 1%-igen, wässrigen Pikrinsäurelösung, die Norleucin als inneren Standard enthielt, vermischt. Das dadurch ausgefällte Eiweiß wurde abzentrifugiert (10 min bei 4000 Umdrehungen/min). 25 ml des klaren Überstandes wurden über eine Anionenaustauschersäule (Dowex 2 x 10, Cl⁻-Form, 200-400 mesh, Austauschersäule 0 2 cm, Harzhöhe 2 cm) von der Pikrinsäure gereinigt. Das Eluat aus der Säule wurde im Vakuumrotationsverdampfer bei maximal 60°C

auf 1 - 2 ml eingeengt und mit Citratpuffer pH 2.2 auf 10 ml aufgefüllt. Der Puffer enthielt als Antioxidans 20 ml/l Thiodiglycol, 0.1 ml/l Caprylsäure als Konservierungsmittel sowie 4.5 ml/l einer 20%-igen Brij 35-(Polyoxiäthyl-laurylalkohol)-Lösung.

Bis zur Analyse wurden die Proben bei -20°C aufbewahrt. Die Bestimmung der einzelnen Aminosäuren erfolgte mit der bereits erwähnten automatischen Apparatur zur Ionenaustauschchromatographie (s. S. 14). Die Reaktionstemperatur der 60 cm langen Austauschersäule betrug zu Beginn der Analyse 30°C und wurde nach Elution des Citrullins auf 56°C erhöht. Der Pufferwechsel von pH 3.05 auf pH 4.28 erfolgte nach Elution des Valins. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug für die Pufferlösungen 60 ml/h und für das Ninhydrinreagens 40 ml/h. Die Gesamtanalysendauer betrug bei diesem Vorgehen 4 1/2 h. Die basischen Aminosäuren wurden bei einer Betriebstemperatur von zunächst 30°C mit einem Citratpuffer pH 5.28 eluiert. Nachdem das Ornithin vom Lysin abgetrennt war, wurde zur rascheren Elution des Arginins die Reaktionstemperatur auf 55°C erhöht. Die Gesamtdauer für die Bestimmung der basischen Aminosäuren betrug bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 80 ml/h für den Puffer und von 40 ml/h für das Ninhydrinreagens 135 Minuten.

Unmittelbar nach der Blutentnahme aus der Pfortader wurde der sich noch im Magen befindliche Futteranteil entnommen, gruppenweise vereinigt und auf den Trockensubstanzgehalt untersucht.

Die bei den Ergebnissen angegebenen Zeitpunkte für die Blutentnahme und die Feststellung des Mageninhaltes beziehen sich immer auf das erste Tier der Versuchsgruppe (zumeist 4 Ratten). Da für die Blutgewinnung pro Ratte 3-4 Minuten benötigt wurden, bedeutet diese Angabe in Wirklichkeit eine Zeitdauer von ca. 15 Minuten.

Tab. 1 Zusammensetzung der Hochproteindiäten

Versuch Nr.	I	II	III	IV	V+VI
Proteinträger ⁺ entspr. einem Rohproteinbeitrag der Ration von	75%	74%	75%	75%	75%
Cellulose	2	2	2	2	1
Sojaöl	1	2	2	2	2
Mineralstoff- mischung ⁺⁺	5	4	4	5	4
Vitaminvor- mischung ⁺⁺⁺	1	1	1	1	1
Saccharin	-	0.15	0.15	-	-
alpha-Aminoisobuttersäure ⁺⁺⁺⁺	0-1.5	1.5	1.5	-	1
Wasser ad	100	100	100	100	100

⁺ Proteinträger waren Sojaprotein bzw. Casein

⁺⁺ Mineralstoffmischung: entsprechend einem Zusatz pro kg Futter (bei 5% im Futter) von
 12.3756 g CaCO_3 , 11.5 g $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 8.5 g K_2HPO_4 (sicc.),
 6.5 g NaCl, 6.0 g Na_2HPO_4 (sicc.), 4.0 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,
 0.4 g Fe-Citrat, 0.37 g $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.033 g ZnCO_3 ,
 0.016 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.0004 g KJ, 0.008 g NaF

⁺⁺⁺ Vitaminvormischung: entsprechend einem Zusatz pro kg Futter von
 5000 IE Vit.A, 500 IE Vit.D₃, 50 mg Vit.E, 1 mg Vit.K₃,
 20 mg Vit.C, 20 mg Vit.B₁·HCl, 20 mg Vit.B₂, 10 mg
 Vit.B₆·HCl, 50 mg Pantothentat, 50 mg Nikotinsäure,
 2000 mg Cholinchlorid, 2 mg Folsäure, 100 mg Inosit,
 100 mg p-Aminobenzoesäure, 30 mcg Vit.B₁₂, 200 mcg
 Biotin

⁺⁺⁺⁺ AIBA war jeweils nur in den Probediäten enthalten

II. Ergebnisse

1. Verwendung von alpha-Aminoisobuttersäure (AIBA) als Indikator zur Messung der Anflutung freier Aminosäuren im Pfortaderplasma - Versuch I -

Ziel dieses Versuches war es, festzustellen, bei welchem Gehalt an AIBA im Futter diese nicht metabolisierbare Aminosäure in nachweisbarer Konzentration im Pfortaderplasma anflutet.

Hochproteinadaptierte, erwachsene Ratten (s. S.16) erhielten eine Probemahlzeit ähnlicher Zusammensetzung wie die Vordiat (s. Tab. 1) mit Säurecasein als Proteinquelle. Neben einer AIBA-freien Kontrollldiat wurden Testmahlzeiten mit 0.5, 1.0 und 1.5 % Aminoisobuttersäure angeboten. Im Anschluß an die Fütterung dieser 4 Rationen wurden jeweils nach 1.5 und 3 Stunden Pfortaderblut und Mageninhalt entnommen. Tab. 2 gibt Aufschluß über die Magenentleerung, die in etwa gleichmäßig verlief.

Tab. 2 Mageninhalt (g Trockensubstanz pro Ratte)
nach Fütterung der verschiedenen Rationen

AIBA-Gehalt im Futter	0 % AIBA	0.5 % AIBA	1.0 % AIBA	1.5%AIBA
Zeit nach der Fütterung				
1.5 h	0.77	0.73	0.88	0.80
3 h	0.50	0.45	0.40	0.43

Anfängliche Schwierigkeiten, AIBA bei der Ionenaustauschchromatographie vom Alanin abzutrennen, wurden durch Senkung des pH-Wertes beim Citratpuffer (von pH 3.28 auf pH 3.05) behoben. AIBA wurde unter diesen Bedingungen (s. auch S. 14) nach dem Alanin, jedoch noch vor dem Valin eluiert.

Wie aus Tab. 3 ersichtlich, ist die AIBA-Konzentration im Pfortaderplasma dem Gehalt dieser Aminosäure in der Probe-

Tab. 3 Konzentration an freien Aminosäuren im Pfortaderplasma

I = 1.5 h nach einer Probemahlzeit (2 g)
II = 3 h nach einer Probemahlzeit (2 g)

% AIBA in der Probemahlzeit			0 %	0.5%	1.0%	1.5%
Aminosäuren (μ Mol/100 ml)	Nüchtern- wert					
Threonin	21	I	75	58	73	90
		II	65	54	59	68
Serin	25	I	98	74	87	112
		II	74	62	66	77
Glutamin/ Asparagin	30	I	106	70	87	100
		II	87	68	67	69
Prolin	2	I	15	13	16	18
		II	16	13	15	17
Glutamin- säure	13	I	55	47	52	63
		II	50	34	34	44
Glycin	32	I	58	42	52	60
		II	49	42	44	54
Alanin	67	I	236	216	206	239
		II	220	176	174	215
AIBA	-	I	0	4	8	12
		II	0	4	8	12
Valin	20	I	95	73	79	88
		II	88	69	67	77
Methionin	5	I	24	17	20	20
		II	18	15	16	17
Isoleucin	11	I	61	47	52	61
		II	52	42	41	47
Leucin	19	I	94	66	70	85
		II	69	59	59	60
Tyrosin	8	I	39	31	30	37
		II	24	20	20	21
Phenylalanin	8	I	26	19	21	25
		II	23	19	18	18
Histidin	8	I	34	26	33	37
		II	27	26	26	24
Lysin	40	I	124	93	137	148
		II	103	85	93	95
Arginin	12	I	23	18	24	25
		II	21	16	20	15

mahlzeit direkt proportional. Die 3-Stundenwerte liegen in gleicher Höhe wie die 1,5-Stundenwerte. Vermutlich halten sich bis zu diesem Zeitpunkt Resorption, Verteilung und Ausscheidung im Gleichgewicht.

Wenn man die Werte für die übrigen Aminosäuren im Plasma vergleicht, so zeigt sich eine gewisse Abhängigkeit vom AIBA-Gehalt im Futter. Bei allen Aminosäuren liegen die Konzentrationen nach Verabreichung der Rationen mit 0.5 % und 1.0 % alpha-Aminoisobuttersäure niedriger als bei den Gruppen ohne AIBA. Erstaunlicherweise ist beim Futter mit 1.5 % AIBA dieser Unterschied zur Kontrolle nicht mehr feststellbar. Diese Befunde ergeben sich sowohl aus den 1.5-Stundenwerten, wie auch aus den 3-Stundenwerten.

2. Modellgemische aus Sojaprotein und Sojaöl

a. Erhitzung in einem Temperaturbereich von 85 - 176°C

- Versuch II a, b, c-

Für Versuch II wurde isoliertes Sojaprotein (Purina Assay-Protein RP 100) in einer Menge von jeweils 1.5 kg allein oder nach einem Zusatz von 10 Prozent Sojaöl hitzebehandelt. Diese Proben wurden mit gewichtsgleichen Anteilen Wasser angerührt und in einer 3 cm dünnen Schicht auf emaillierten Blechschalen im Luftstrom 24 Stunden bei 85°, 95°, 105°, 115°, 125°, 138°, 146°, 160° und 176°C erhitzt. Anschließend wurden die Proben fein gemahlen. Die in dieser Weise behandelten Sojaproteine ohne Ölzusatz (= Kontrollprotein) zeigten eine bei 115°C beginnende und weiterhin zunehmende Braunverfärbung (bei 176°C - schwarzbraune Farbe). Das zusammen mit dem Sojaöl erhitzte Eiweiß war bei jeweils gleicher Temperaturbelastung etwas dunkler als die Kontrolle und insgesamt von mehr krümelig-weicher Konsistenz.

Um auch während der nun folgenden Ätherextraktion gleiche Bedingungen zu schaffen, wurden den ohne Öl erhitzten Proben zuvor 10 Prozent Sojaöl zugesetzt. Anschließend wurden alle Chargen mit Diäthyläther nach dem Soxhlet-Verfahren extrahiert. Alle extrahierten Proben wurden auf den Gehalt an Rohprotein und an verfügbarem Lysin (DNFB-Methode) untersucht. Nach dem Ergebnis dieser Analysen wurden 11 Proben (einschließlich des unerhitzten Sojaproteins) für die Untersuchungen zur Anflutung freier Aminosäuren im Pfortaderblut ausgewählt.⁺

Tabelle 4 zeigt eine Übersicht über die Auswirkung der angewendeten Temperaturen auf den Aminosäuregehalt. Aminosäureverluste sind erstmals bei den auf 138°C erhitzten Proteinen festzustellen. Besonders das Lysin liegt hier um ca. 9 % niedriger. Diese Verluste erhöhen sich für die bei 160°C erhitzten Proben auf 20 %. In ähnlicher Größenordnung lag der Abfall für die beiden anderen basischen Aminosäuren Histidin und Arginin. Weiterhin ist der Ge-

⁺Die bei 176°C erhitzten Proben wurden aufgrund des äußerst geringen Gehalts an verfügbarem Lysin von 0.6% (g/16g N) für die weiteren Untersuchungen nicht mehr herangezogen.

Tab.4

Gehalt an verfügbarem Lysin und an Aminosäuren (g/16g N) sowie die Peroxidzahl in Modellgemischen aus Sojaprotein und Sojabl.

Erhitzungs- temperaturen	—*	Sojaprotein				Sojaprotein + 10% Öl					
		95°C	115°C	125°C	138°C	160°C	95°C	115°C	125°C	138°C	160°C
% Rohprotein	90.2	92.8	92.7	92.5	92.4	92.5	90.0	89.0	87.3	85.4	84.6
% verfügbares Lysin**	5.3	5.0	4.6	4.4	3.8	1.7	5.1	4.2	3.9	3.2	1.7
% Aminosäuren**											
Asparaginsäure	12.1	12.4	12.6	13.0	13.2	12.8	13.1	12.6	13.0	13.1	13.1
Threonin	4.3	4.2	4.3	4.2	4.3	3.5	4.2	4.1	4.1	4.1	3.8
Serin	5.6	5.6	5.8	6.0	6.0	5.0	5.7	5.8	6.0	5.8	4.9
Glutaminsäure	23.2	22.1	22.6	22.7	23.6	22.7	22.8	22.1	23.0	23.2	23.3
Prolin	5.5	5.2	4.9	5.1	5.0	4.9	5.3	4.9	4.9	5.3	5.4
Glycin	4.9	4.6	4.7	4.7	4.8	4.7	4.9	4.6	4.6	4.7	4.7
Alanin	4.5	4.4	4.4	4.6	4.7	4.8	4.7	4.6	4.5	4.8	4.8
Valin	5.1	5.0	4.8	4.9	5.2	5.0	4.9	4.9	4.8	5.0	5.1
Methionin	1.2	1.0	1.1	1.0	1.1	1.0	1.1	1.0	1.1	1.2	1.0
Isoleucin	5.1	5.1	5.1	5.0	5.1	4.9	5.1	5.0	5.1	5.1	5.0
Leucin	7.9	8.0	8.1	7.9	8.1	7.9	8.0	7.9	8.1	8.1	8.0
Tyrosin	4.1	4.1	4.1	4.0	4.0	3.9	4.1	3.8	4.1	4.1	3.7
Phenylalanin	5.8	5.9	5.9	5.8	5.8	5.6	5.7	5.6	5.8	5.9	5.8
Lysin	6.6	6.3	6.3	6.6	6.0	5.3	6.4	6.6	6.5	6.0	5.0
Histidin	2.8	2.6	2.7	2.8	2.7	2.4	2.8	2.8	2.8	2.7	2.2
Arginin	8.7	8.3	8.4	8.5	8.5	7.9	8.2	8.5	8.5	8.5	7.7
Peroxidzahl***	—	—	—	—	—	—	200	14	3	0	0

* = unerhitztes Sojaprotein

** = in g/16g N

*** = Milliäquivalente Sauerstoff pro kg Fett

halt an Threonin, Serin und Tyrosin deutlich vermindert. In allen Fällen liegen die Werte bei dem mit Fett auf 160°C erhitzten Muster etwas niedriger. Bei den restlichen Aminosäuren sind keine größeren Unterschiede festzustellen.

Während der (nach salzsaurer Hydrolyse ermittelte) Lysin-gehalt auch bei den auf 160°C erhitzten Proben mit 5.0 - 5.3 % noch etwa bei 80 % des Ausgangswertes liegt, ist der Gehalt an verfügbarem Lysin (DNFB-Methode) wesentlich stärker abgefallen (von 5.3 % auf 1.7 %). Zwischen den Kontrollchargen (= ohne Öl) und den zusammen mit Soja-öl auf 115°, 125° und 138° erhitzten Proben konnte ein deutlicher Unterschied im Gehalt an verfügbarem Lysin nachgewiesen werden.

Versuch II a: Die zur Bestimmung der Anflutung freier Aminosäuren im Pfortaderplasma ausgewählten Ratten wogen zwischen 220 und 270 g. Während der Anpassungszeit (s. S. 16) erhielten diese Tiere eine Hochproteinration (s. Tab. 1) mit folgender Mischung als Proteinquelle: 40 % Sojaprotein unbehandelt, 60 % Sojaprotein erhitzt (aus gleichen Teilen der 10 für die Untersuchung ausgewählten hitzebehandelten Chargen). 45 Minuten nach Verabreichung der Testmahlzeit (2 g) wurden Pfortaderblut und Mageninhalt entnommen. Die Blutentnahme wurde deshalb auf den Termin von 45 min nach der Testmahlzeit festgelegt, da sich in früheren Versuchen gezeigt hatte, daß zu diesem Zeitpunkt die größten Unterschiede im Aminosäuregehalt zu erwarten sind (s. hierzu auch spätere Versuche sowie Seite 17).

Mit der zunehmenden Temperaturbelastung und der damit verminderten Proteinqualität des Futters war eine deutlich beschleunigte Magenentleerung verbunden (s. Tab. 5).

Tab. 5 Mageninhalt (g Trockensubstanz pro Ratte) bei einzelnen Versuchsgruppen 45 Minuten nach der Testmahlzeit von 2 g der verschiedenen hitzebehandelten Proteine

Erhitzungstemperatur:	-	95°C	115°C	125°C	138°C	160°C
Sojaprotein	0.96	0.97	0.99	0.83	0.70	0.48
Sojaprotein + 10% Öl	-	0.93	0.92	0.88	0.72	0.38

Abbildungen 1 a, b und c zeigen die relativen Konzentrationen der Aminosäuren im Pfortaderplasma. Diese Werte ergaben sich aus den Plasmawerten nach Fütterung der verschiedenen Testproteine im Verhältnis zu dem unerhitzt gebliebenen Testprotein (= 100 %). Die gleichzeitig im Pfortaderplasma auftretende Konzentration an alpha-Aminoisobuttersäure wurde als Korrekturfaktor einbezogen. Nachstehende Formel gibt den Rechengang wieder:

$$\frac{(k_{1,2...} - K_0) \times F_{1,2...} \times 100}{K - K_0} = \text{relative Konzentration}$$

$k_{1,2...}$ = Konzentration an freien Aminosäuren ($\mu\text{Mol}/100 \text{ ml}$) 45 Min. nach Fütterung der verschiedenen erhitzten Sojaproteine ($_{1,2...}$)

K = Konzentration an freien Aminosäuren ($\mu\text{Mol}/100 \text{ ml}$) 45 Min. nach Fütterung des unerhitzt gebliebenen Sojaproteins

K_0 = Nüchternkonzentration

$F_{1,2...}$ = Faktor berechnet aus der Konzentration an AIBA im Pfortaderplasma (bei einem Gehalt der Testmahlzeit von 1.5 % AIBA) nach Fütterung der hitzebehandelten Sojaproteine ($_{1,2...}$) im Verhältnis zur AIBA-Konzentration nach Verabreichung des unerhitzt gebliebenen Proteins

Mit zunehmender Hitzebehandlung sinken die relativen Konzentrationen an freien Aminosäuren im Pfortaderblut ab. Die bei 160°C erhaltenen Werte liegen zumeist nur geringfügig über der Nüchternkonzentration. Beim Vergleich der

Abb. 1a

„Relative Konzentrationen“ an freien Aminosäuren im Pfortaderplasma 45 Minuten nach Fütterung unterschiedlich hitzebehandelter Proteine.

□ = Sojaprotein ▨ = Sojaprotein + Öl

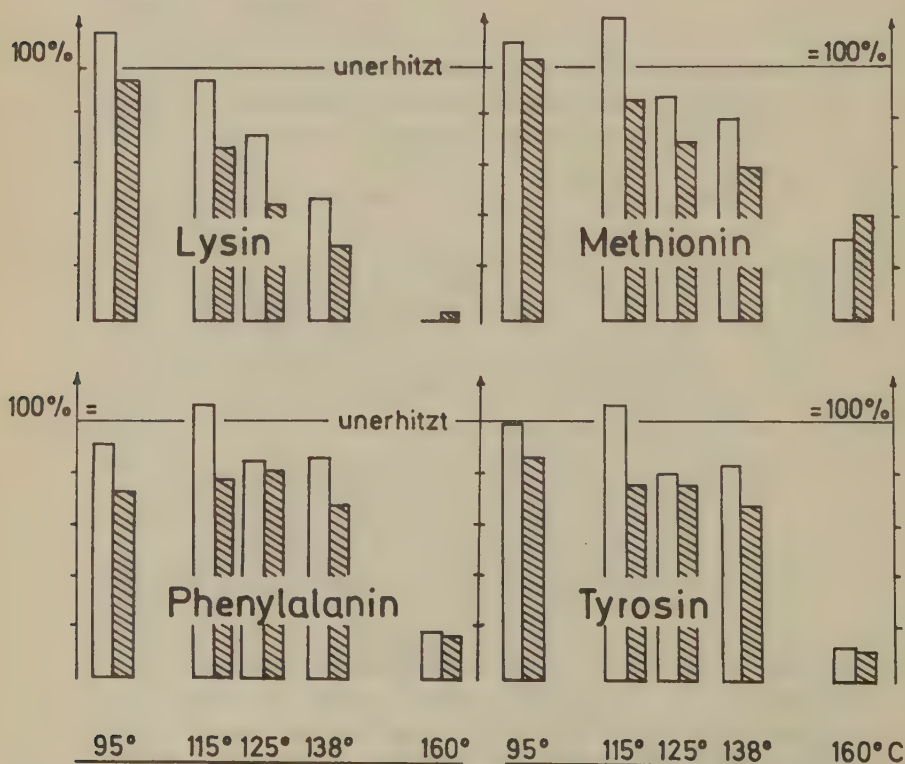


Abb. 1b

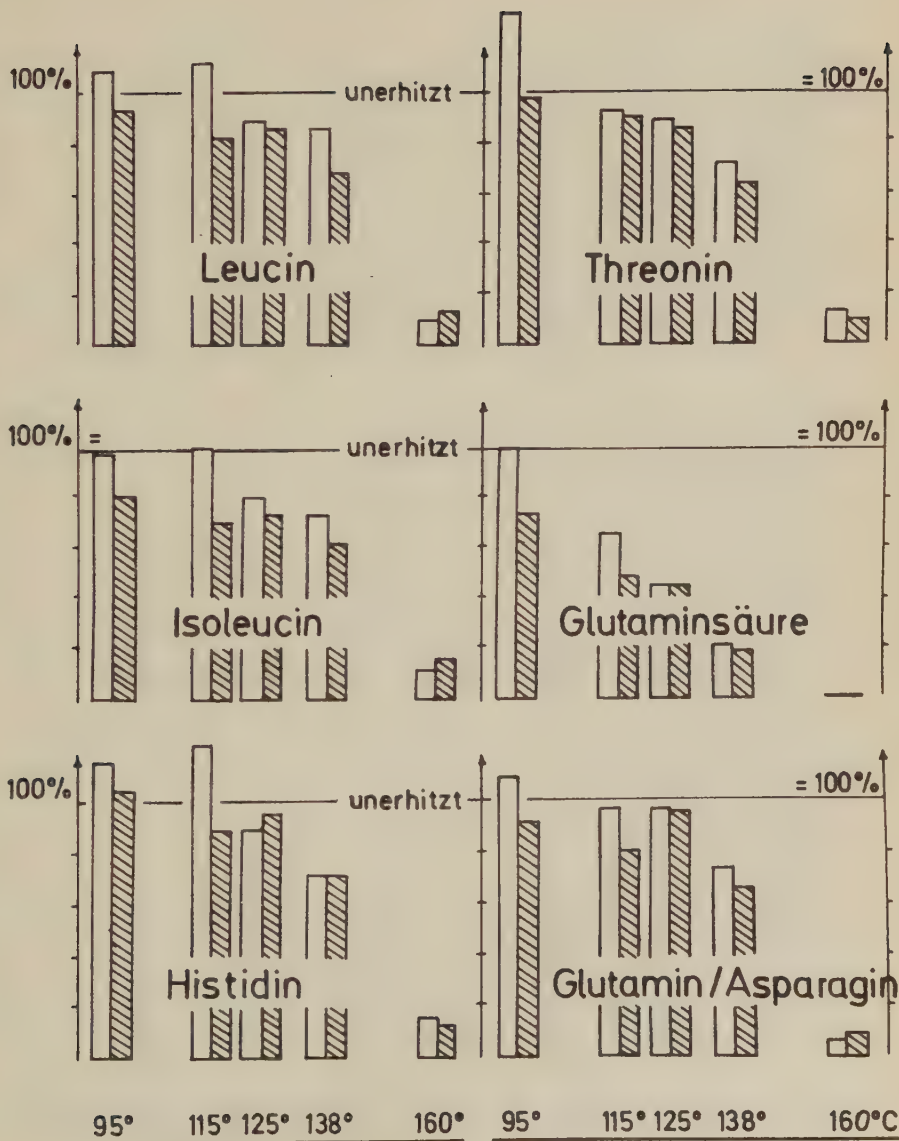
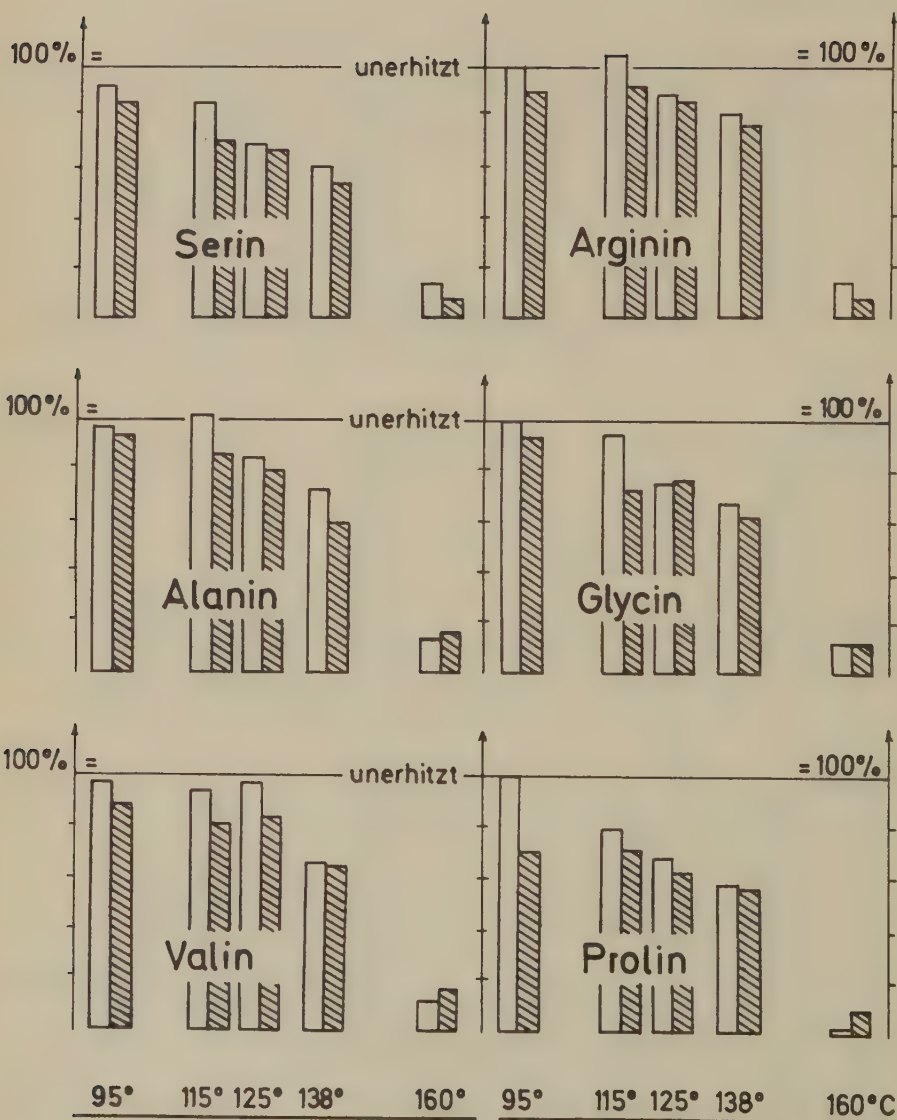


Abb. 1c



Aminosäurenanflutung nach Verabreichung des mit Fett erhitzten Sojaproteins mit den Werten des allein erhitzten Sojaproteins zeigt sich, daß vor allem das Lysin geschädigt wurde. Die größten Unterschiede ergaben sich im Temperaturbereich von 115 - 125°C. Eine ähnlich verlaufende, jedoch weitaus geringere Verminderung erlitten die Aminosäuren Methionin, Phenylalanin, Tyrosin, Leucin und Threonin.

Die unerhitzt gebliebene Probe enthielt vermutlich Trypsinhibitoren, die bei der Hitzebehandlung inaktiviert wurden. Daraus erklärt sich die höhere Aminosäurenanflutung bei den schonend erhitzten Proben (95°).

Versuch II b: In einem ergänzenden Versuch mit 3 - 4 Wochen alten Ratten sollte festgestellt werden, inwieweit sich die aus dem Pfortaderversuch ergebende Verminderung der Aminosäurenverfügbarkeit auf das Wachstum der Ratten auswirkt.

Da die hitzebehandelten Testproteine für einen Wachstumsversuch mit Ratten nicht mehr ganz ausreichten, wurden jeweils die bei 115°C und 125°C sowie die bei 138° und 146°C erhitzten Chargen vereinigt. Zusammen mit einem schonend (95°C) und einem extrem hoch (160°C) hitzebehandelten Protein wurden diese Gemische bei einem Rohprotein-gehalt von 12.1 - 12.6 % gefüttert (6 Gruppen, s.Tab. 7). Eine Casein enthaltende Diät diente als Kontrolle. Die Zusammensetzung der Futtergemische geht aus Tabelle 6 hervor.

Tab. 6 Zusammensetzung der Versuchsdiäten
 (Versuch mit wachsenden Ratten)

Sojaprotein bzw. Casein entsprechend einem Rohproteinbeitrag von	12 %
Rohrzucker	20
Sojaöl	5
Cellulose	2
Mineralstoffmischung ⁺	6
Vitaminmischung ⁺	1
DL-Methionin	0.15
Maisstärke	ad. 100.

⁺Zusammensetzungen der Vormischungen s. Tab. 1

Schon bei der ersten Wägung der Tiere am 8. Versuchstag zeigten sich Gewichtsverluste bei den Gruppen mit den stark hitzegeschädigten Proteinen (160°C) in Höhe von 3 - 5 g pro Ratte. Die Tiere wurden daraufhin aus dem Versuch genommen und erneut in zwei gewichtsgleiche Gruppen eingeteilt (Versuch II c). Die eine Gruppe erhielt eine Ration mit 6 % Protein aus dem unerhitzt gebliebenen isolierten Sojaprotein. Die Ratten der anderen Gruppe bekamen über diesen Proteingehalt hinaus eine Zulage von 4 % Protein aus den auf 160°C erhitzten Chargen des isolierten Sojaproteins.

Das Ergebnis der beiden Versuche mit wachsenden Ratten ist in Tabelle 7 aufgezeigt. Wie daraus ersichtlich ist, konnten die mittels der Pfortadertechnik erhaltenen Ergebnisse durch den Wachstumsversuch bestätigt werden. Dies gilt sowohl für das Ausmaß der Proteinschädigung mit zunehmender Hitzebehandlung (auch das ungünstige Ergebnis bei der Gruppe mit dem auf 160°C erhitzten Protein kann hier einbezogen werden) als auch für die Unterschiede zwischen den allein erhitzten Sojaproteinen und den zusammen mit Fett hitzebehandelten Proben.

Das Ergebnis von Versuch II c zeigt jedoch, daß das stark (160°C) hitzegeschädigte Protein - vermutlich aber nur im Rahmen der stark eingeschränkten Verdaulichkeit - immerhin verwertet werden kann. Da jedoch in diesen mehr zur Information dienenden Versuch keine Gruppen mit Zulagen an unerhitztem Sojaprotein einbezogen wurden (sogenannte positive Kontrolle), kann das Ausmaß der Proteinverwertung aus den hitzegeschädigten Chargen nicht quantifiziert werden. Auch aus dem Ergebnis des Pfortaderversuchs ergibt sich ja eine wenn auch nur geringe Verfügbarkeit der Aminosäuren.

Tab. 7 Entwicklung wachsender Ratten und Protein Efficiency Ratio⁺ (PER) bei Fütterung von unter verschiedenen Bedingungen erhitzten Sojaproteinen

Versuch II b

Versuchsgruppe	g Zunahme (18 Tage)	g Futter/ g Zunahme	PER ⁺
1 Casein (Kontrolle)	117±7.7	2.02±0.04	3.78±0.09
2 Sojaprotein schonend erhitzt (95° + 105°C)	99±6.7	2.45±0.08	3.26±0.11
3 Sojaprotein bei 115+125°C erhitzt	91±6.1	2.56±0.04	3.22±0.06
4 Sojaprotein bei 115+125°C mit Öl erhitzt	83±9.9	2.76±0.15	2.95±0.16
5 Sojaprotein bei 138+146°C erhitzt	60±9.4	3.12±0.07	2.55±0.06
6 Sojaprotein bei 138+146°C mit Öl erhitzt	43±6.0	3.80±0.15	2.13±0.09

Versuch II c

	g Zunahme (18 Tage)	g Futter/ g Zunahme	PER ⁺⁺
1 Sojaprotein unerhitzt (Rohproteingehalt 6 %)	25±4.9	5.41±0.58	-
2 wie 1 + 4% hitzebehandeltes Protein (160°C)	37±6.0	4.49±0.40	-

+ = g Zunahme pro g Proteinaufnahme

++ = aufgrund des unterschiedlichen Proteingehalts der Rationen waren die PER-Werte nicht vergleichbar

Mit Ausnahme der in der Klammer befindlichen unterscheiden sich alle übrigen Werte statistisch signifikant ($p < 0.05$).

b. Erhitzung von Sojaprotein bei 162°C - Versuch III -

In Versuch II wurden nach der Testmahlzeit der sehr stark hitzebehandelten Proteine überraschend geringe Aminosäurenkonzentrationen im Pfortaderblut festgestellt. Aus diesem Grunde wurde in einem weiteren Versuch die Aminosäurenanflutung im Pfortaderplasma nach Fütterung ähnlich behandelter Proteine über eine längere Zeitdauer (45 - 225 Min) verfolgt. Das entsprechende Sojaprotein wurde mit einer gewichtsgleichen Menge Wasser angerührt, 24 Stunden bei 125°C im Luftstrom getrocknet und anschließend weitere 24 Stunden einer Temperatur von 162°C ausgesetzt. In gleicher Weise wurde eine Mischung behandelt, die aus isoliertem Sojaprotein mit 10 % Sojaöl bestand. Die hitzebehandelten, festgewordenen, dunkelbraunen Chargen wurden ähnlich wie in Versuch II weiterverarbeitet (Mahlen, Fettextraktion s. S. 22).

Die Peroxidzahl (POZ) des zugesetzten Fettanteils lag vor und nach dem Erhitzen bei Null.

Bei den Aminosäurenanalysen wurden ähnliche Ergebnisse (Tab. 8) erhalten wie bei den Modellmischungen in Versuch II. Bemerkenswert ist, daß trotz der hohen Temperatureinwirkung analytisch kein Abfall an Cystin festzustellen war.

Für die Bestimmung der Aminosäurenanflutung im Pfortaderplasma wurden 16 Gruppen (jeweils 4 Ratten) mit einer Hochproteindiät, die das unerhitzte Sojaprotein als Eiweißträger enthielt, in der auf S.16 beschriebenen Art und Weise vorgefüttert. Die als Testmahlzeit vorgesetzten Mischungen mit den hocheerhitzten Proteinen wurden jedoch trotz der 24-stündigen Fastenperiode nicht vollständig verzehrt. Daraufhin erhielten die Tiere weitere 7 Tage lang eine Mischung aus unerhitztem mit hitzebehandeltem (162°C) Sojaprotein (s. S.16). Die Vordiat und die als Testmahlzeit vorgesehenen Mischungen enthielten diesmal zusätzlich 0.15 % Saccharin (s. auch Tab. 2).

Auch bei diesem Versuch war eine deutlich beschleunigte Magenentleerung festzustellen, wenn die hitzebeschädigten Proteine verabreicht worden waren (Tab. 9).

Tab. 8

Gehalt (g/16g N) und relative Verfügbarkeit der Aminosäuren in einem unerhitzten und in zwei hitzebehandelten Sojaproteinen (ohne bzw. mit Sojaöl bei 162°C).

	I Sojaprotein unerhitzt	II Sojaprotein erhitzt	II relativ (I = 100)	III Sojaprotein +öl erhitzt	III relativ (I = 100)	relative Verfügbarkeit II/I III/I	*
% Rohprotein	**90.2	92.5	(39)	87.1	(38)	-	-
% verfügbares Lysin	5.3	2.1	(39)	2.0	(38)	-	-
% Aminosäuren							
Cystin	1.1	1.1	(100)	1.1	(100)	-	-
Asparaginsäure	12.1	12.5	(103)	12.1	(100)	-	-
Threonin	4.3	4.0	93	3.8	88	6%	8%
Serin	5.6	5.2	93	5.3	95	10%	7%
Glutaminsäure	23.2	22.4	97	22.0	95	20%	12%
Prolin	5.5	5.7	103	5.5	100	33%	28%
Glycin	4.9	4.5	92	4.3	89	15%	9%
Alanin	4.5	4.6	102	4.4	98	21%	21%
Valin	5.5	5.4	98	5.4	98	8%	17%
Methionin	1.4	1.3	93	1.2	86	54%	38%
Isoleucin	5.1	5.2	102	5.1	100	17%	17%
Leucin	7.9	8.0	101	8.0	101	21%	21%
Tyrosin	4.1	3.6	88	3.6	88	18%	4%
Phenylalanin	5.8	5.4	93	5.7	99	8%	1%
Lysin	6.6	5.6	85	5.2	79	22%	10%
Histidin	2.8	2.7	97	2.3	82	38%	37%
Arginin	8.7	8.5	(98)	8.0	(92)	57%	69%

* Berechnet nach der Formel:
$$\frac{(K_1 - K_0) + (K_2 - K_0) \dots \times 100}{(K_1 - K_0) + (K_2 - K_0) \dots}$$

** Dinitrofluorbenzolmethode

Tab. 9 Mageninhalt (g Trockensubstanz pro Ratte)
bei den einzelnen Versuchsgruppen nach der
Fütterung

Zeitabstand nach der Fütterung (in min)	45	90	135	180	225
Sojaprotein unerhitzt	0.98	0.83	0.63	0.30	0.20
Sojaprotein bei 162°C erhitzt	0.44	0.50	0.17	0.37	0.12
Sojaprotein bei 162°C mit Öl erhitzt	0.53	0.30	0.43	0.14	0.20

In den Abbildungen 2 a - c ist die Anflutung freier Aminosäuren im Pfortaderplasma bis zu 225 Minuten nach der Fütterung dargestellt. Die höchste Aminosäurenkonzentration nach Verabreichung des unerhitzt gebliebenen Sojaproteins lag zumeist beim 45-Minuten-Wert. Bei den hitzebehandelten Proteinen wurden Maximalwerte im allgemeinen erst zu einem etwas späteren Zeitpunkt erhalten. Allerdings waren die Aminosäurenkonzentrationen insgesamt wesentlich geringer. Um eine Gesamtbewertung aller Daten durchführen zu können, wurde die Summe der Einzelkonzentrationen über dem Nüchternwert für das jeweilige hitzegeschädigte Protein auf die Summe der Einzelkonzentrationen bei der Kontrolle (hier das unerhitzt gebliebene Sojaprotein) bezogen. Dieses Verhältnis, das ein Maß für die unterschiedliche Aminosäurenanflutung darstellt, wird von ERBERSDOBLER (38) als relative Verfügbarkeit bezeichnet. Ihre Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$\frac{(k_1 - K_0) + (k_2 - K_0) \dots \times 100}{(K_1 - K_0) + (K_2 - K_0) \dots} = \text{relative Verfügbarkeit}$$

K = Konzentration an freien Aminosäuren (µMol/100 ml)
nach Fütterung des Kontrollproteins

k = Konzentration an freien Aminosäuren (µMol/100 ml)
nach Fütterung des hitzegeschädigten Proteins

K₀ = Nüchternkonzentration

K_{1,2} usw. = Konzentration an freien Aminosäuren zu
verschiedenen Zeiten nach Verabreichung der
Probediät

Abb. 2a

Konzentration an freien Aminosäuren
im Pfortaderplasma ($\mu\text{Mol} / 100 \text{ ml}$)
nach Fütterung von:

•——• isoliertem Sojaprotein
x— — — x bei 162°C hitzebehandeltem
Sojaprotein

Δ Δ bei 162°C mit Öl erhitztem
Sojaprotein

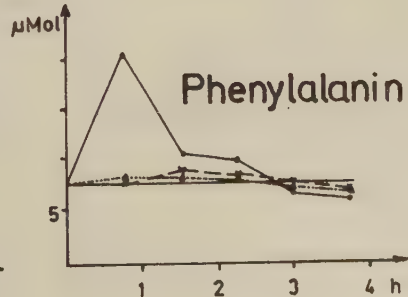
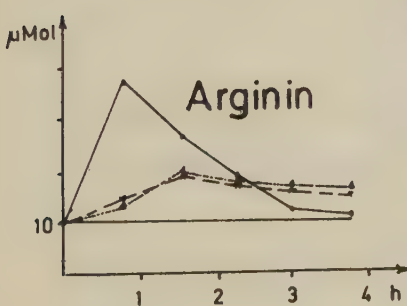
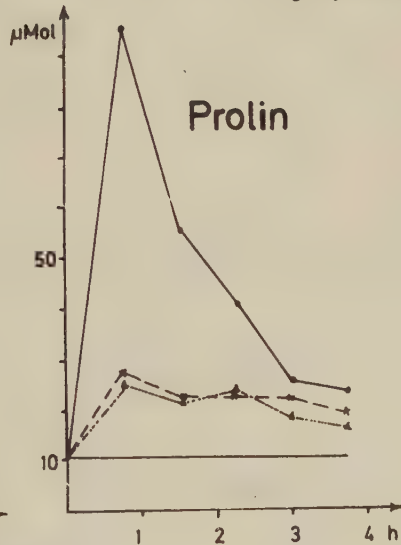
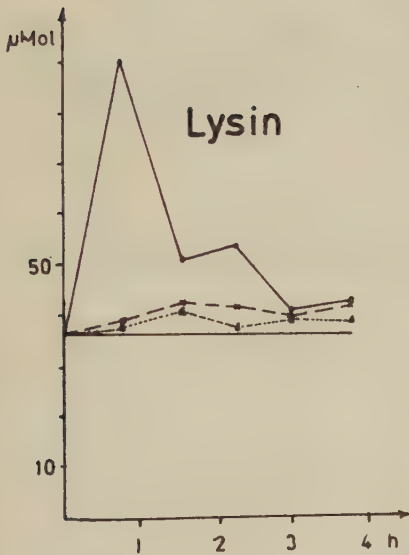


Abb. 2 b

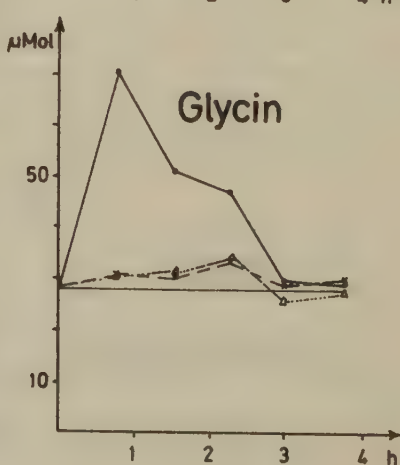
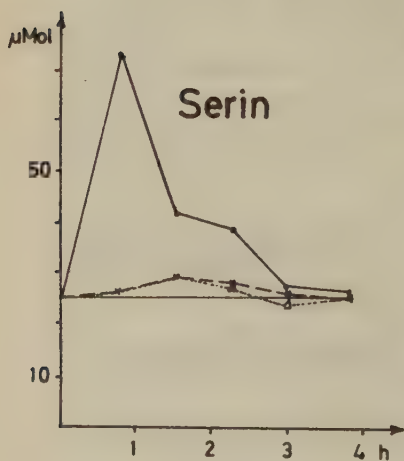
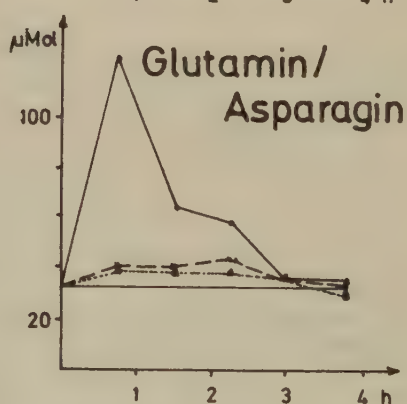
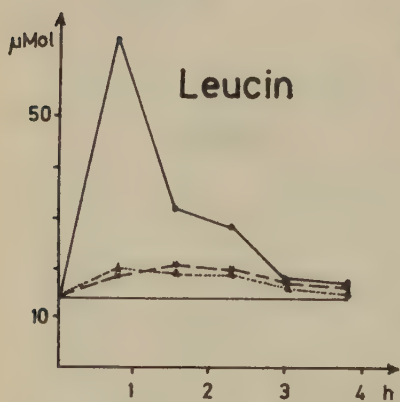
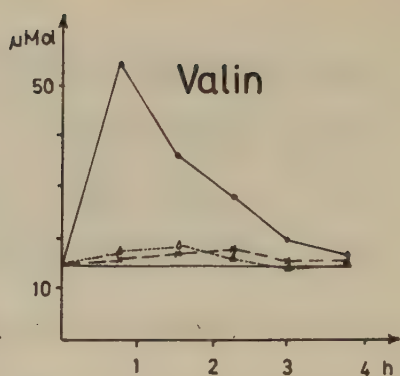
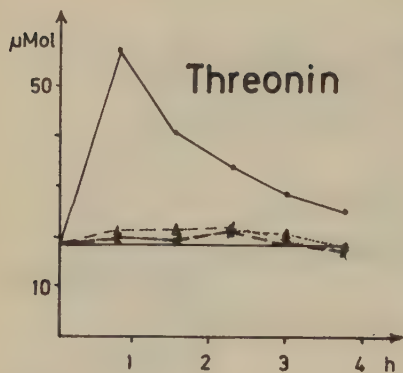
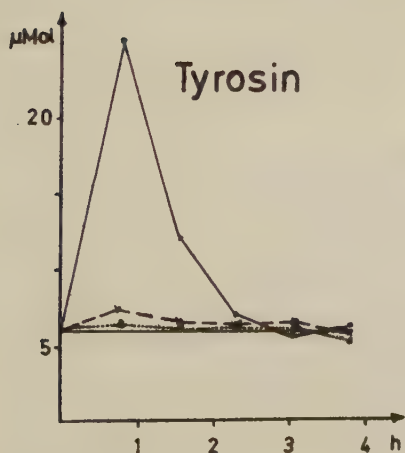
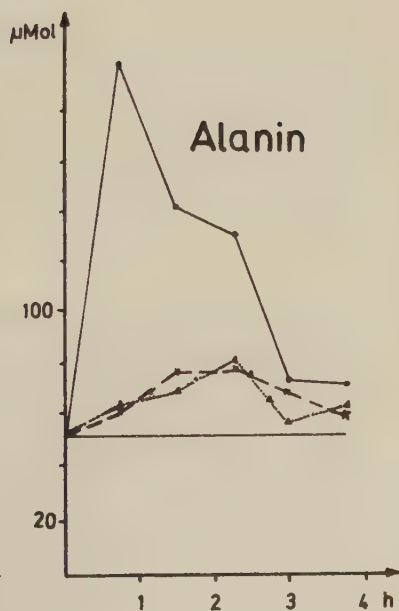
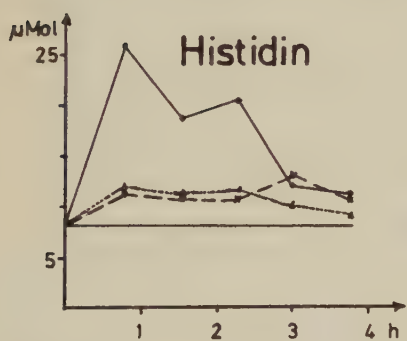
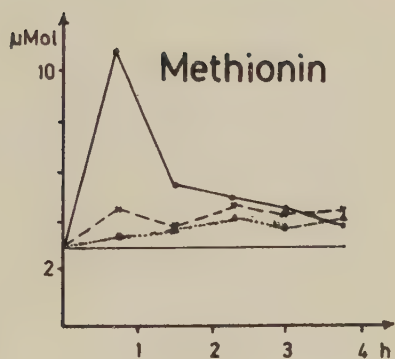
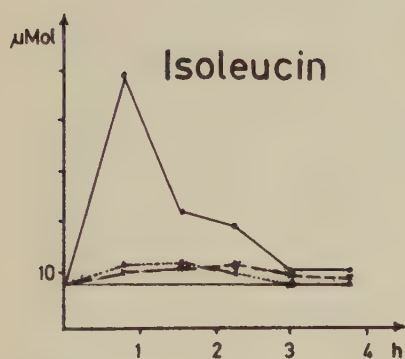


Abb. 2c



Das Ergebnis dieser Berechnungen zeigt Tabelle 13. Wie man daraus ansehen kann, ist gemessen am unerhitzt gebliebenen Sojaprotein die Verfügbarkeit bei allen Aminosäuren erheblich vermindert. Lediglich für Arginin wurden überraschend hohe Werte erhalten (s. hierzu auch S.35). Beim Gstin wurde die Verfügbarkeit nicht berechnet, da mit Ausnahme des 45-Minuten-Wertes alle Cystinkonzentrationen unter dem Nüchternspiegel lagen. Wenn man die Verfügbarkeitswerte für das allein erhitzte und das mit Öl behandelte Protein vergleicht, so lassen sich große Unterschiede nur beim Tyrosin, Phenylalanin und Lysin erkennen.

3. Modellgemische aus Casein mit Sojaöl

a. Erhitzung bei 110°C

- Versuch IV -

Für Versuch IV wurden 3 kg Säurecasein mit 3 l Wasser vermischt, in ca. 3 cm dicker Schicht 24 h bei 110°C im Luftstrom erhitzt und anschließend weitere 24 h bei 60°C getrocknet. Ein Gemisch aus Casein mit 10 % Sojaöl und dem entsprechenden Wasserzusatz wurde ebenso behandelt. Danach wurde das Öl wie in Versuch I beschrieben extrahiert.

Die Ergebnisse der Analysen zeigt Tabelle 10.

Der Aminosäurenbestimmung nach zu urteilen, ergaben sich keine Unterschiede zwischen dem unerhitzt gebliebenen und dem hitzebehandelten Casein. Lediglich der Gehalt an verfügbarem Lysin ließ erkennen, daß es durch die Erhitzung zu einer Proteinschädigung gekommen war. Ein Anstieg der Peroxidzahl von 0 auf 208 bzw. der Aldehydzahl von 0 auf 25 weist auf die oxidativen Veränderungen im Sojaöl während des Erhitzungsprozesses hin.

Die in der Vorperiode zum Pfortadertest verwendete Hochproteindiät enthielt gleiche Anteile des unerhitzten, des bei 110°C erhitzten und des zusammen mit Sojaöl hitzebehandelten Caseins. Die genaue Rationszusammenstellung ist aus Tabelle 1 ersichtlich.

Die in Tabelle 11 aufgezeigten Werte für den Mageninhalt (Trockensubstanzgehalt) lassen keine Unterschiede in der Magenentleerung erkennen.

Während der Untersuchungen wurde im Pfortaderplasma, das nach Fütterung des zusammen mit Fett erhitzten Caseins gewonnen worden war, eine zunächst unbekannte, ninhydrinpositive Verbindung gefunden. Bei diesem zusätzlichen, unsymmetrischen, manchmal sogar gespaltenen "Peak" im Aminosäurechromatogramm (zwischen Harnstoff und Asparaginsäure), handelt es sich um die Stereoisomeren des Methioninsulfoxids. Tatsächlich war auch beim Methionin die relative Verfügbarkeit vor allen anderen Aminosäuren am meisten vermindert. Die quantitative Bestimmung der Konzentration an Methioninsulfoxid ist schwierig, da der unregelmäßig geformte und

Tab. 10 Aminosäuregehalt (in g/16g N) sowie Peroxid- und Aldehydzahl in den verschiedenen hitzebehandelten Casein-Sojabölgemischen.

	Versuch IV (110°C)	Versuch V (112°C)	Versuch VI (136°C)	
Casein	Casein erhitzt	Casein mit Öl erhitzt	Casein mit Öl erhitzt	Casein mit oxi- diertem Öl erhitzt
% Rohprotein	83.8	86.7	84.6	87.6
% verfügbares Lysin *	7.7	7.2	7.0	7.4
% Aminosäuren				
Asparaginsäure	7.9	8.1	8.0	8.0
Threonin	5.4	5.2	5.4	5.4
Serin	7.1	6.9	6.9	6.8
Glutaminsäure	26.8	27.8	27.8	27.8
Prolin	11.5	12.6	11.6	12.2
Glycin	2.3	2.2	2.2	2.2
Alanin	3.6	3.5	3.4	3.5
Valin	8.2	8.3	8.2	8.1
Methionin	3.3	3.2	3.2	3.4
Isoleucin	5.9	6.0	6.1	5.8
Leucin	10.9	10.4	10.4	10.3
Tyrosin	6.4	6.7	6.4	6.6
Phenylalanin	6.2	6.2	6.1	6.0
Lysin	9.3	9.1	9.3	9.4
Histidin	3.3	3.5	3.5	3.4
Arginin	4.4	4.3	4.4	4.5
POZ ** vor/nach Erhitzen	-	-	0/208	8/261
AZ *** vor/nach Erhitzen	-	-	0/25	0/16
			24/0	24/0

* = Dinitrofluorbenzolmethode

** = Peroxidzahl (Milläquivalente Sauerstoff pro kg Fett) *** = Aldehyd- bzw. Benzidinalzahl (E/g)

zudem relativ kleine Peak nicht in üblicher Weise (so-geannte Höhe x Weite-Methode) ausgewertet werden konnte. Es wurde daher versucht, unter Beibehaltung der Gesamtfläche einen symmetrischen Peak zu bilden, der dann ausgewertet wurde.

Auch bei den übrigen Aminosäuren lagen in diesem Versuch die Aminosäurenkonzentrationen nach der Testmahlzeit des zusammen mit Fett erhitzten Caseins immer niedriger als die nach der Fütterung des ohne Öl hitzebehandelten Proteins erhaltenen Werte (s. Tab. 12 und Abb. 3).

Tab. 11 Mageninhalt (g Trockensubstanz pro Ratte)
nach Fütterung von unterschiedlich hitze-
behandeltem Casein⁺

Versuch IV	Mageninhalt pro Ratte		
	Casein	Casein erhitzt	Casein mit Öl erhitzt
nach 1 h	1.03	0.95	0.98
nach 2 h	-	0.75	0.85
nach 3 h	-	0.35	0.42
Versuch V	Casein	Casein mit Öl erhitzt	Casein mit oxi- diertem Öl erh.
nach 3/4 h	1.20	1.00	1.20
nach 1 1/2 h	-	1.00	1.10
nach 2 1/4 h	-	0.90	0.80
nach 3 3/4 h	-	0.45	0.45
Versuch VI	Casein autoklaviert	Casein m. Öl autoklaviert	Casein m. oxidier- tem Öl autoklaviert
nach 1 h	1.0	1.0	1.0
nach 2 h	0.8	0.8	0.8
nach 3 h	0.5	0.5	0.6
nach 5 h	0.1	0.1	0.1

⁺ Pro Ratte wurde in allen 3 Versuchen jeweils 2 g einer
Hochproteindiät gefüttert

Tab. 12 Konzentration an freien Aminosäuren im Pfortaderplasma (in $\mu\text{Mol}/100\text{ ml}$) bis zu 3 Stunden nach einer Probemahlzeit (Versuch IV)

I = Casein unerhitzt

II = Casein bei 110°C erhitzt

III = Casein mit Sojaöl bei 110°C erhitzt

Aminosäuren ($\mu\text{Mol}/100\text{ ml}$)		Zeit nach der Fütterung				relative Verfügbarkeit
		0	1 h	2 h	3 h	
Methionin	I	5	15	-	-	63
	II		15	15	13	
	III		12	12	9	
Serin	I	20	59	-	-	67
	II		53	60	50	
	III		51	46	32	
Threonin	I	22	67	-	-	68
	II		50	60	53	
	III		50	44	38	
Isoleucin	I	8	32	-	-	68
	II		30	31	26	
	III		27	23	17	
Leucin	I	12	45	-	-	68
	II		49	43	34	
	III		39	34	22	
Alanin	I	49	119	-	-	70
	II		107	135	129	
	III		107	96	100	
Lysin	I	54	138	-	-	74
	II		142	121	90	
	III		132	108	63	
Histidin	I	6	26	-	-	74
	II		25	25	15	
	III		21	22	10	
Valin	I	20	68	-	-	75
	II		58	60	57	
	III		51	55	40	
Prolin	I	11	111	-	-	75
	II		103	125	122	
	III		99	92	89	
Phenylalanin	I	5	13	-	-	78
	II		16	13	13	
	III		14	12	10	

Fortsetzung der Tab. 12

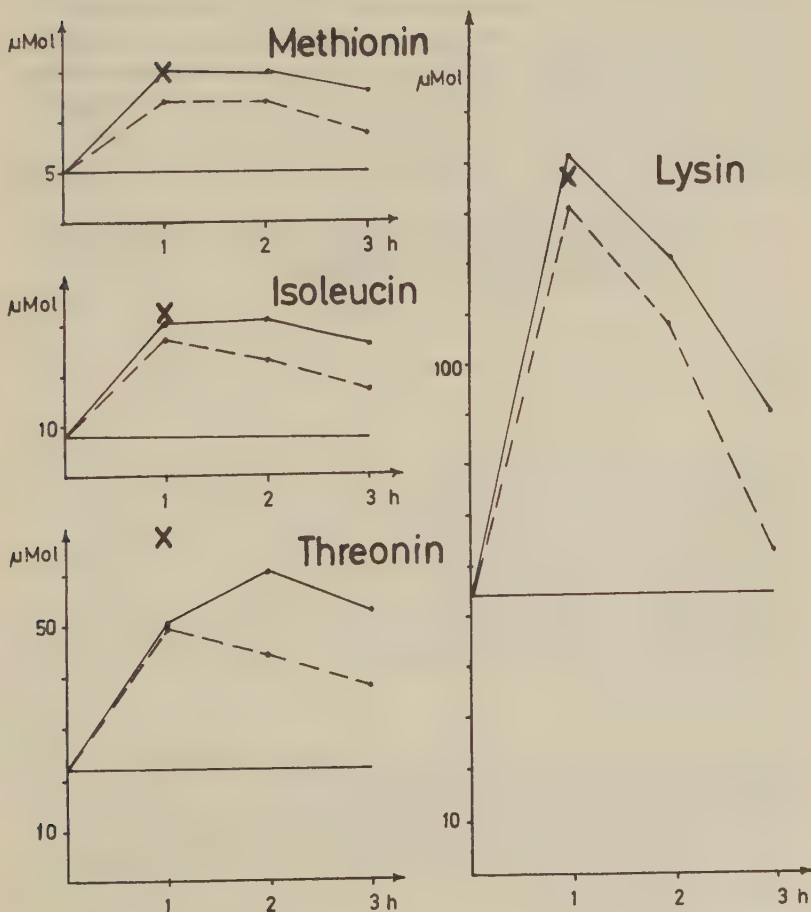
Aminosäuren (μ Mol/100 ml)		Zeit nach der Fütterung				relative Verfügbarkeit
		0	1 h	2 h	3 h	
Tyrosin	I	4	21	-	-	80
	II		21	14	12	
	III		16	14	10	
Glutamin/ Asparagin	I	22	40	-	-	80
	II		53	61	43	
	III		56	49	34	
Glutaminsäure	I	8	25	-	-	82
	II		20	17	15	
	III		17	17	13	
Glycin	I	24	370	-	-	82
	II		363	373	364	
	III		330	314	266	
Arginin	I	15	31	-	-	83
	II		32	25	17	
	III		30	23	16	
Methionin- sulfoxid	III		7	6	4	-

Zur Berechnung der relativen Verfügbarkeit (s. S. 34) dienten diesmal die Aminosäurenkonzentrationen nach Fütterung des allein erhitzten Caseins als Bezugswerte (II = 100).

Abb.3

Konzentration an freien Aminosäuren im Pfortaderplasma ($\mu\text{Mol}/100\text{ml}$) nach Fütterung von

- x Casein (Einzelwert)
- Casein bei 110°C erhitzt
- - - Casein mit Öl bei 110°C erhitzt



b. Erhitzung zusammen mit oxidiertem Sojaöl bei 112°C

- Versuch V -

In Versuch V sollte festgestellt werden, ob es beim Erhitzen von Proteinen zusammen mit oxidiertem Öl zu einer noch größeren Aminosäureschädigung kommt als bei Hitzebehandlung in Gegenwart von nicht oxidiertem Öl.

Bei der Oxidation des Fettes wurde bewußt auf die Anwendung von Oxidationsmitteln verzichtet, um nicht zusätzliche Reaktionspartner für das Eiweiß zu schaffen. In einem Glasgefäß wurden 150 ml des zu oxidierenden Sojaöls auf 105°C erwärmt und mit Luftsauerstoff durchperlt, wobei ständig umgerührt wurde. In bestimmten Zeitabständen nach Beginn der Oxidation wurde eine Probe entnommen und auf den peroxidisch gebundenen Sauerstoff untersucht. Das Ergebnis zeigt Tab. 13.

Tab. 13 Peroxidzahl (in Milliäquivalenten Sauerstoff pro kg Fett) während der Oxidation von Sojaöl in Relation zur Behandlungszeit

Stunden:	3	4 3/4	5 3/4	6 1/4	6 3/4	7 1/4	7 3/4	8 1/4	8 1/2
POZ:	41	95	158	200	320	430	515	558	575

Anschließend wurden 600 g Casein mit 60 g des oxidierten Sojaöls vermischt, mit Wasser im Verhältnis 1:1 angerührt und dann 24 Stunden bei 112°C im Luftstrom erhitzt. Ein entsprechendes Gemisch aus Casein mit nicht oxidiertem Sojaöl wurde unter gleichen Bedingungen behandelt. Nach Zerkleinerung und Fettextraktion wurden gelbbraune Mehle gewonnen, wobei die mit oxidiertem Öl erhitzte Charge etwas dunkler war.

Wie aus Tabelle 10 zu ersehen ist, traten hinsichtlich des Aminosäuregehalts keine Unterschiede auf. Die Bestimmung des verfügbaren Lysins ergab jedoch für das zusammen mit dem oxidierten Sojaöl hitzebehandelten Protein einen geringfügig niedrigeren Wert.

Auch diese beiden Proteine wurden mittels der Pfortader-technik verglichen. Die in der Vorperiode verwendete Hochproteindiät enthielt das unerhitzt gebliebene Casein. In diesem Versuch erhielt eine weitere Gruppe von 4 Ratten eine Testmahlzeit mit dem unerhitzten Casein. Die entsprechende Blutprobe wurde 45 Minuten nach der Testmahlzeit gewonnen.

Die Magenentleerung erfolgte bei allen Versuchsgruppen gleichmäßig (s. Tab. 11). Nach Verabreichung des zusammen mit oxidiertem Öl erhitzten Caseins war bei einigen Aminosäuren die Anflutung in der Pfortader offensichtlich verzögert (Abb. 4). Für Lysin und Arginin wurden insgesamt niedrigere Werte gefunden, sodaß die relative Verfügbarkeit dieser beiden Aminosäuren bei dem Protein, das mit oxidiertem Öl erhitzt worden war, niedriger lag (Tab. 14). Der Methioninsulfoxidgehalt des Pfortaderplasmas war nach Fütterung des mit oxidiertem Öl behandelten Proteins höher als nach der Testmahlzeit des mit frischem Sojaöl erhitzten Caseins.

Tab. 14 Konzentration an freien Aminosäuren im Pfortader-plasma (in $\mu\text{Mol}/100\text{ ml}$) bis zu 3 3/4 Stunden nach einer Probemahlzeit (Versuch V)

I = Casein unerhitzt

II = Casein mit unbehandeltem Sojaöl bei 112°C erhitzt

III = Casein mit oxidiertem Sojaöl bei 112°C erhitzt

Aminosäuren ($\mu\text{Mol}/100\text{ ml}$)		0	Zeit nach der Fütterung				relative Verfüg- barkeit
			3/4 h	1 1/2 h	2 1/4 h	3 3/4 h	
Arginin	I	9	13	-	-	-	75
	II		19	19	12	13	
	III		13	15	15	13	
Lysin	I	46	93	-	-	-	78
	II		103	102	77	74	
	III		91	79	80	67	
Serin	I	24	74	-	-	-	86
	II		71	62	59	54	
	III		52	56	68	48	
Glutamin- säure	I	9	32	-	-	-	90
	II		33	26	26	19	
	III		28	25	30	14	
Glutamin/ Asparagin	I	25	60	-	-	-	93
	II		70	60	55	50	
	III		58	57	64	47	
Histidin	I	5	26	-	-	-	95
	II		22	21	13	16	
	III		19	17	18	15	
Methionin	I	6	22	-	-	-	95
	II		18	19	15	12	
	III		17	16	16	13	
Leucin	I	13	52	-	-	-	98
	II		53	62	41	40	
	III		54	49	53	37	
Threonin	I	21	60	-	-	-	98
	II		54	49	46	48	
	III		42	48	58	47	
Isoleucin	I	9	43	-	-	-	99
	II		42	38	31	32	
	III		37	36	39	29	
Alanin	I	80	214	-	-	-	100
	II		204	172	165	145	
	III		166	163	192	164	

Fortsetzung der Tab. 14

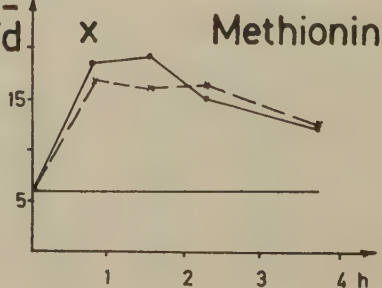
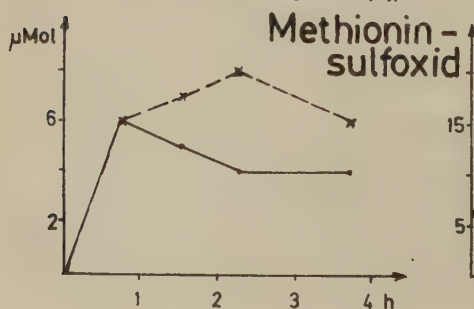
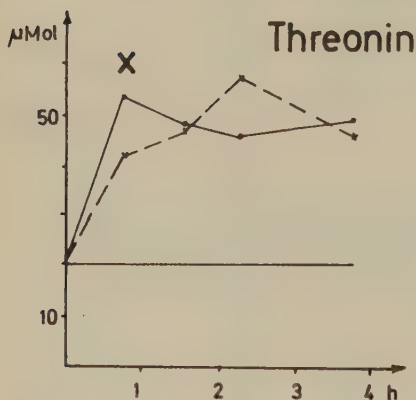
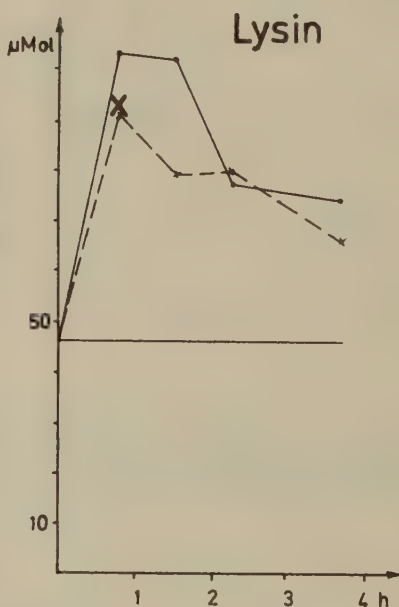
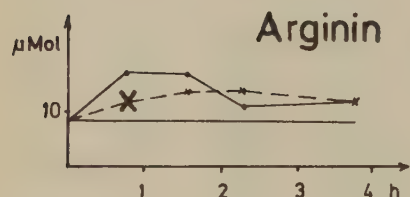
Aminosäuren (μ Mol/100 ml)		0	Zeit nach der Fütterung				relative Verfüg- barkeit
			3/4 h	1 1/2 h	2 1/4 h	3 3/4 h	
Tyrosin	I	8	31	-	-	-	101
	II		32	32	20	16	
	III		33	26	26	16	
Valin	I	19	73	-	-	-	105
	II		66	71	61	58	
	III		68	65	70	62	
Prolin	I	24	148	-	-	-	103
	II		133	118	112	130	
	III		94	119	153	137	
Glycin	I	27	510	-	-	-	103
	II		505	400	380	376	
	III		380	420	535	376	
Phenyl- alanin	I	9	18	-	-	-	106
	II		19	19	14	15	
	III		19	18	18	14	
Methionin- sulfoxid	I	0	-	-	-	-	129
	II		6	5	4	4	
	III		6	7	8	6	

Zur Berechnung der relativen Verfügbarkeit (s. S. 34) dienten die Aminosäurenkonzentrationen nach Fütterung des zusammen mit nicht oxidiertem Öl erhitzten Caseins als Bezugswerte (II = 100)

Abb. 4

Konzentration an freien Aminosäuren im Pfortaderplasma ($\mu\text{Mol} / 100 \text{ ml}$) nach Fütterung von

- x Casein (Einzelwert)
- Casein mit Öl erhitzt
- - - Casein mit oxidiertem Öl erhitzt



c. Autoklavierung von Casein zusammen mit oxidiertem und nicht oxidiertem Sojaöl (3 h bei 136°C) - Versuch IV -

In diesem Versuch wurde der Einfluß einer Erhitzung von Casein mit oxidiertem und nicht oxidiertem Sojaöl in Abwesenheit von Luftsauerstoff auf die relative Aminosäurenverfügbarkeit untersucht.

Hierfür wurden 60 g oxidiertes Sojaöl (Herstellung s. Versuch V) mit 60 ml Wasser und 600 g Casein vermischt, in mehrere, ca. 450 cm³ fassende Patentverschlußdosen abgefüllt und in einen Exsikkator verbracht. Durch wiederholtes Evakuieren und Füllen des Exsikkators mit Stickstoff wurde der Sauerstoff aus der Testmischung verdrängt. Anschließend wurden die Dosen verschlossen und 3 Stunden bei 136°C in einem Hochdruckdampfsterilisator erhitzt. In gleicher Weise wurde das Gemisch aus Casein mit dem oxidierten Sojaöl sowie das Casein ohne Ölzusatz behandelt. Nach der Autoklavierung wurden die Proteine gemahlen, bei Zimmertemperatur getrocknet und schließlich einer Fettextraktion unterworfen.

Hinsichtlich des Aussehens und des Aminosäuregehaltes konnten keine Unterschiede zwischen den 3 Proben festgestellt werden (s. Tab. 10). Auch der Gehalt an verfügbarem Lysin war zwar dem unbehandelten Casein gegenüber um 12 % vermindert, innerhalb der autoklavierten Chargen jedoch gleich.

Zur weiteren Beurteilung im Pfortadertest wurden die Versuchstiere an eine Hochproteindiät mit unbehandeltem Casein als Eiweißquelle adaptiert. Die Zusammensetzung der Vor- und Probendiäten war denen in den bisher beschriebenen Versuchen ähnlich (s. Tab. 1). Bei diesem Versuch verlief die Magenentleerung bei allen Versuchsgruppen gleichmäßig (s. Tab. 11).

Die Konzentrationen der freien Aminosäuren im Pfortaderplasma bis zu 5 Stunden nach der Fütterung sind in Tab. 15 aufgeführt. Abb. 5 zeigt zusätzlich einen Auszug der Ergebnisse (graphische Darstellung für 4 Aminosäuren). Besonders bemerkenswert war, daß in keiner der untersuchten Blutproben Methioninsulfoxid nachgewiesen werden konnte.

Aus den Zahlen für die relative Verfügbarkeit ergibt sich, daß Lysin, Arginin und Methionin bei den mit Öl behandelten Proteinen, unabhängig vom Oxidationsgrad des Sojaöls etwas stärker geschädigt worden waren als bei dem allein erhitzten Casein. Bei den übrigen Aminosäuren sind die Unterschiede nicht so deutlich bzw. einheitlich.

Tab. 15 Konzentration an freien Aminosäuren im Pfortaderplasma (in $\mu\text{Mol}/100 \text{ ml}$) bis zu 5 Stunden nach einer Probemahlzeit (Versuch VI)

I = Casein autoklaviert

II = Casein mit unbehandeltem Sojaöl autoklaviert

III = Casein mit oxidiertem Sojaöl autoklaviert

Aminosäuren ($\mu\text{Mol}/100 \text{ ml}$)		Zeit nach der Fütterung					relative Verfüg- barkeit
		0	1 h	2 h	3 h	5 h	
Lysin	I	38	75	66	58	46	
	II		67	61	54	41	76
	III		73	59	50	43	79
Arginin	I	7	13	16	15	11	
	II		17	12	15	10	89
	III		15	14	11	11	85
Methionin	I	5	17	16	14	9	
	II		16	14	12	8	84
	III		17	15	11	8	86
Tyrosin	I	6	24	19	18	12	
	II		27	18	17	9	94
	III		24	18	11	10	80
Phenyl- alanin	I	7	17	17	16	10	
	II		20	16	15	9	100
	III		18	15	12	10	84
Alanin	I	56	159	141	141	136	
	II		145	150	119	96	82
	III		155	159	127	97	89
Glutamin- säure	I	9	26	22	20	16	
	II		29	18	19	13	92
	III		24	22	18	13	86
Glutamin/ Asparagin	I	20	46	44	46	31	
	II		45	43	39	32	91
	III		47	47	35	30	91
Isoleucin	I	7	35	29	31	18	
	II		33	29	26	17	91
	III		34	34	26	18	98
Valin	I	13	51	44	48	31	
	II		54	46	43	26	96
	III		52	53	42	31	103
Glycin	I	25	410	420	401	370	
	II		465	410	376	320	98
	III		460	456	386	354	110

Fortsetzung der Tab. 15

Aminosäuren (μ Mol/100 ml)		Zeit nach der Fütterung				5 h	relative Verfüg- barkeit
		0	1 h	2 h	3 h		
Threonin	I	17	45	46	49	37	
	II		48	46	42	36	96
	III		46	50	44	35	98
Serin	I	18	56	52	52	36	
	II		60	52	46	35	98
	III		57	57	42	34	95
Histidin	I	4	21	17	16	11	
	II		16	18	16	9	90
	III		20	18	14	12	98
Leucin	I	13	54	38	49	26	
	II		51	46	41	26	98
	III		51	50	36	27	98
Prolin	I	13	100	92	112	53	
	II		100	113	81	53	97
	III		110	130	106	58	109

Zur Berechnung der relativen Verfügbarkeit (s. S. 34) dienten die Konzentrationen nach Fütterung des ohne Ölzusatz autoklavierten Caseins als Bezugswerte (I = 100).

Abb.5

Konzentration an freien Aminosäuren im Pfortaderplasma ($\mu\text{Mol} / 100 \text{ ml}$) nach Fütterung von

- Casein autoklaviert
- *--* Casein mit Öl autoklaviert
-●..... Casein mit oxidiertem Öl auto=klaviert

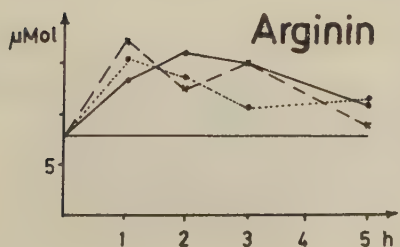
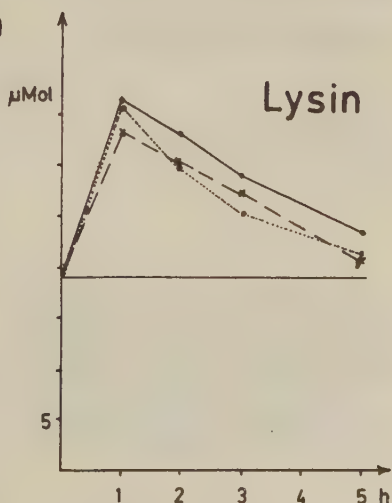
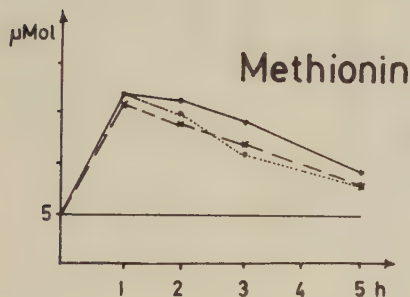
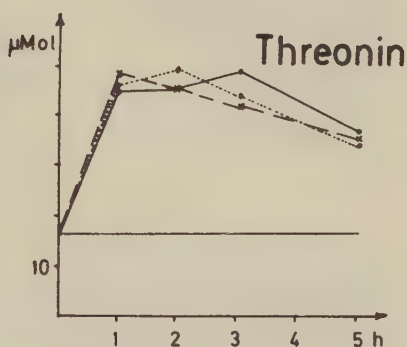
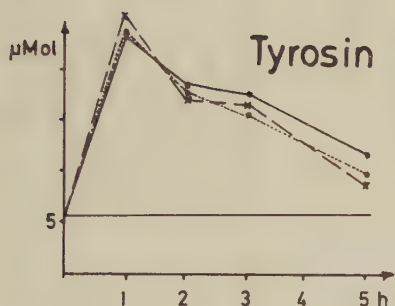
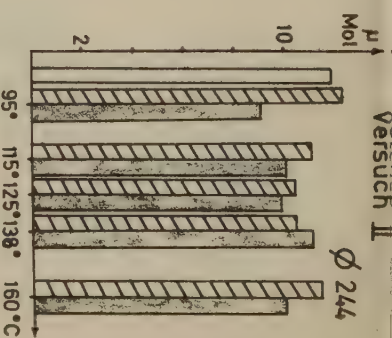
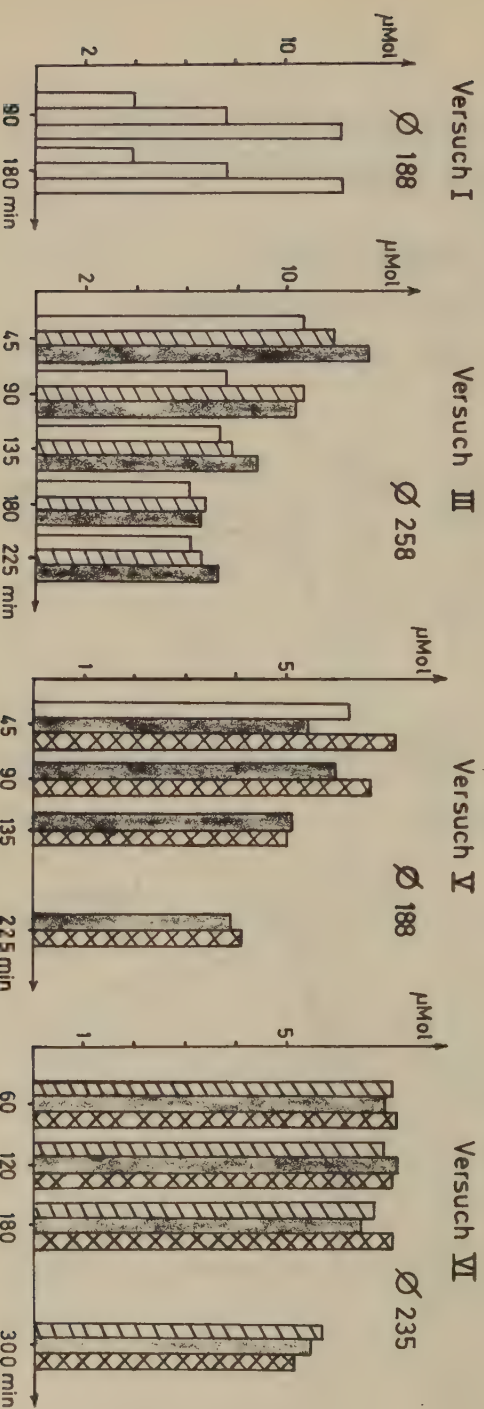


Abb. 6

ALBA-Konzentrationen im Pfortaderplasma ($\mu\text{Mol}/100\text{ ml}$) in Abhängigkeit von ALBA-Gehalt und der Qualität des Futters.

- ☐ = unerhitzt
☒ = erhitzt
 ∅... = durchschnittliches Gewicht der Ratten
- ☒ = mit Öl erhitzt
☒ = mit oxidiertem Öl erhitzt



III. Diskussion und Schlußfolgerungen

1. Modellgemische

Für die vorliegenden Untersuchungen sollten definierte Proteine verwendet werden, die in einem möglichst schonenden Herstellungsverfahren gewonnen wurden. Isoliertes Sojaprotein als Vertreter eines Eiweißes pflanzlicher Herkunft kommt dieser Anforderung sehr nahe. Es weist einen sehr hohen Eiweißgehalt auf. Die niedrigen Konzentrationen an übrigen Rohnährstoffen, die sich als zusätzliche, schlecht zu kontrollierende Faktoren während einer Erhitzung erweisen könnten, sind gering (83). Um die bei Erhitzung evtl. stattfindende Methioninschädigung genauer zu untersuchen, schien allerdings der Methioningehalt des Sojaproteins etwas zu niedrig zu sein. Daher wurde Säurecasein, das 3,3 % Methionin im Protein enthält, als weiteres Testprotein verwendet.

Raffiniertes Sojaöl gehört aufgrund seines Fettsäuren-musters in die Gruppe von Futterfetten, die vorwiegend aus langkettigen, ungesättigten Fettsäuren bestehen. Da die Oxidationsneigung in der Reihenfolge gesättigte Fettsäuren, Monoenfettsäuren, Di- und Polyenfettsäuren zunimmt (52), war dieses Öl für Untersuchungen über den Einfluß oxidativ veränderter Fette auf Nahrungsproteine gut geeignet. Tatsächlich wurden auch durch Einleiten von Luft in erhitztes Sojaöl sehr hohe Peroxidzahlen (bis POZ = 575) erhalten. Deutlich erkennbar war die Oxidation auch beim Erhitzungsprozess in Anwesenheit von Casein bzw. Sojaprotein an der Luft.

2. Untersuchungsverfahren

Auf eine ausführliche, kritische Beurteilung der angewendeten Methoden zur Aminosäurenanalytik nach dem Ionenaustauschverfahren wird verzichtet. Es sei hier nur erwähnt, daß bei der Hydrolysendauer von 24 Stunden Valin und Iso-

leucin noch nicht vollständig freigesetzt werden (s. hierzu auch 38, 70). Gleichzeitig kommt es aber bereits zu einer geringgradigen Zerstörung von Threonin und Serin (127). Ferner werden manche Aminosäurenderivate wie z. B. das Umwandlungsprodukt von Methionin in Methioninsulfoxid nicht erfaßt, da während der Hydrolyse das Sulfoxid wieder zum Methionin reduziert wird (98). Eine Oxidation des Cystins zur Cysteinsäure während einer Hitzebehandlung kann quantitativ nicht beurteilt werden, da die Cystinbestimmung über eine Umwandlung in Cysteinsäure erfolgt (s. S. 14).

Wie schon mehrfach festgestellt, sind die Ergebnisse der Aminosäureanalysen in ihrer Aussagekraft hinsichtlich der Qualitätsbeurteilung von hitzegeschädigten Proteinen nur begrenzt verwertbar. Dies ergibt sich auch aus zahlreichen Angaben in der Literatur (12, 26, 29, 87). Auch die Ergebnisse der Aminosäureanalysen an dem vorliegenden Untersuchungsmaterial bestätigen diese Befunde. So lagen vielfach die Aminosäurenwerte in den hitzebehandelten Proteinen genau so hoch wie im Ausgangsprodukt. Es ist daher ein besonderer Nachteil der Aminosäurenbestimmung nach salzsaurer Hydrolyse, daß die tatsächliche Verfügbarkeit der Aminosäuren für den Organismus durch dieses Analysenverfahren nicht nachgewiesen werden kann. Die meisten der enzymresistenten Bindungen im Protein, die für die geringe Verwertung verantwortlich sind, können während der salzsaurer Hydrolyse wieder aufgespalten werden.

Aus diesem Grunde diente die Aminosäurenanalyse bei den vorliegenden Untersuchungen mehr zur Information über den "Bruttogehalt" an Aminosäuren in den hitzebehandelten Proben, wobei unberücksichtigt blieb, welcher Anteil hiervon in ernährungsphysiologisch inaktiver Form vorliegt. Lediglich für das Lysin - immerhin eine der wichtigsten und empfindlichsten essentiellen Aminosäuren - gibt es in der Dinitrofluorbenzolmethode eine hinreichend genaue und brauchbare Routinemethode zur Bestimmung der Verfügbarkeit.

Bei diesem Verfahren können die epsilon-Aminogruppen des Lysins, die noch frei sind, mit Dinitrofluorbenzol nach SANGER (116) reagieren. Es bildet sich eine Dinitrophenyl-(DNP-)Markierungsgruppe, die auch während der nun folgenden Säurehydrolyse erhalten bleibt. Im weiteren Verlauf der Analyse kann nun das DNP-Lysin durch verschiedene Reinigungsverfahren isoliert und quantitativ nachgewiesen werden. Die während der Hydrolyse auftretenden Verluste an DNP-Lysin sind mit 3 - 9 % zumeist nur gering (18,37). In besonderen Fällen - Anwesenheit reduzierender Substanzen - können sich diese Verluste allerdings beträchtlich erhöhen (18, 80, 113, 140). Nach CARPENTER (18) sind bereits Unterschiede der mittleren Lysinwerte (Doppelbestimmung) zweier Futtermittel von 5 % statistisch signifikant, wenn die Untersuchungen in einem Arbeitsgang durchgeführt wurden, was in den vorliegenden Versuchen immer eingehalten wurde. Bei Untersuchungen zu verschiedenen Zeiten sind erst Unterschiede von 8 % als statistisch gesichert anzusehen.

Bei den vorliegenden Versuchen wurde dieses Verfahren für die Kontrolle der Hitzebehandlung und zur Auswahl der erhitzten Proteine für die Tierversuche herangezogen.

Als besonders brauchbar zur Feststellung der Aminosäurenverfügbarkeit bei hitzebehandelten Modellgemischen erwies sich bereits in früheren Versuchen die Bestimmung der Konzentration freier Aminosäuren im Pfortaderplasma nach Fütterung eines Testproteins an hocheiweißadaptierte, erwachsene Ratten (34, 38). Es hatte sich bisher gezeigt, daß die mittels der Pfortadertechnik erhaltenen Ergebnisse gut mit Befunden aus Versuchen an wachsenden Ratten übereinstimmen. Diese Untersuchungen mit wachsenden Tieren zählen zu den klassischen biologischen Nachweisverfahren für die Aminosäurenverfügbarkeit (21, 27, 54, 55, 56, 129, 130). Allerdings bedürfen Wachstumsversuche gegenüber der Bestimmung der Konzentration an freien Aminosäuren im Pfortaderplasma eines beträchtlichen Aufwands an Zeit, Arbeit und Material.

Das Ausmaß der Schädigung einzelner Aminosäuren wurde nach einem Verfahren, das auf der Aminosäurenanflutung in der Pfortader nach Verabreichung der Testproteine basiert, berechnet. Hierbei wurde zumeist die Aminosäurenkonzentration nach Fütterung des in Anwesenheit von Fett hitzegefährdeten Proteins mit der Aminosäurenanflutung nach Verabreichung des allein erhitzten Proteins verglichen. Die dabei ermittelten Verhältniszahlen sollen als "relative

Verfügbarkeit" bezeichnet werden (34, 38).

Die Bezeichnung Verfügbarkeit selbst wäre insofern nicht ganz exakt, als man hierunter zumeist den Anteil des analytisch ermittelten (Säurehydrolyse) Aminosäuregehalts versteht, der im Tier verwertet werden kann. Im vorliegenden Fall wurde jedoch die verfügbare Menge an Aminosäuren im zusammen mit Fett hitzebehandelten Protein auf die "Bruttomenge" an Aminosäuren im Kontrollprotein bezogen und daraus die relative Verfügbarkeit berechnet. Bei den eigenen Versuchen fällt im Gegensatz zu früheren (s. hierzu auch DÜMMER) dieser Unterschied nicht so sehr ins Gewicht, da sich die Aminosäurezusammensetzung des in Anwesenheit von Fett hitzebehandelten Proteins von der des allein erhitzten Sojaproteins bzw. Caseins kaum unterschied.

Sowohl aus den Untersuchungen von ERBERSDOBLER und DÜMMER als auch aus eigenen Ergebnissen geht hervor, daß das Maximum der Aminosäurenkonzentration zumeist 45 bis 60 Minuten⁺ nach Verabreichung der Probemahlzeit auftritt. Ähnliches fanden bereits andere Autoren bei Ratten, Hunden und Schweinen (11, 32, 48, 51). Beim Vergleich zweier Proteine mittels der "Pfortadertechnik" sind somit bereits während der ersten Zeit der Aminosäurenanflutung die größten Unterschiede zu erwarten. Aus diesen Gründen wurden in Versuch II a lediglich die 45-Minuten-Werte als Kriterium für die Verfügbarkeit herangezogen. Dieser Versuch hat dadurch einen mehr informativen Charakter und sollte im Zusammenhang mit den übrigen Versuchen beurteilt werden. Auf der anderen Seite ist es auf diese Weise möglich, wesentlich mehr Testproteine in die Versuchsplanung einzubeziehen.

Durch die Verwendung von alpha-Aminoisobuttersäure als inneren Standard wird die Beurteilung der Aminosäurenverfügbarkeit anhand eines einzelnen 45-Minuten-Wertes präzisiert. AIBA braucht als freie, dem Futter beigemischte Aminosäure nicht erst von den Enzymen des Verdauungstraktes aus dem Proteinverband freigesetzt zu werden. Die Menge der resorbierten AIBA hängt daher im wesentlichen vom Angebot am Resorptionsort und der Resorptionsleistung des Darmepithels ab.

Tatsächlich hatte die Zumischung von AIBA zur Testmahlzeit,

⁺ Der "45-Minuten-Wert" umfaßt eine Zeitdauer für die Blutentnahme (4 Ratten) von ca. 15 Minuten (s. auch S. 17).

gleichmäßige Magenentleerung vorausgesetzt, gut übereinstimmende AIBA-Konzentrationen im Blut zur Folge (Versuch I und VI). Größere Differenzen der AIBA-Konzentrationen im Pfortaderblut, die trotz gleichen AIBA-Gehalts der Testmahlzeit auftraten, können zum Teil durch diese Unterschiede in der Magenentleerung oder aber auch durch eine Behinderung der AIBA-Resorption im Darm als Folge einer Anhäufung unverdaulicher Peptide erklärt werden. Nach BURACZEWSKI können nach der Verdauung hitzegeschädigter Proteine vermehrt Peptide im Dünndarm festgestellt werden (13).

Nach den Ergebnissen von Versuch I ist eine Beeinflussung der Konzentrationen für die übrigen Aminosäuren im Pfortaderblut durch den AIBA-Zusatz nicht ganz auszuschließen. Dies würde mit den Befunden von SMITH (s. hierzu auch S.12) am Geflügel übereinstimmen. Da diese Beeinflussung nur bei einer Dosierung an AIBA (0.5 %) deutlich auftrat, sollte diesem Ergebnis nicht zu viel Bedeutung beigemessen werden, zumal bei den höheren Dosierungen an AIBA mit der Kontrolle übereinstimmende Werte erhalten wurden. Die AIBA-Zugabe lag in den folgenden Versuchen übrigens stets bei 1.0 - 1.5 %.

Eine erst nach Abschluß der experimentellen Arbeit durchgeführte Wiederholung des Versuchs, bei der in je zwei Gruppen zwei Dosierungen (0.5 und 1.5%) an AIBA eingesetzt wurden, zeigte, daß die Pfortaderkonzentrationen für die meisten Aminosäuren durch die Anwesenheit von AIBA im Futter nicht beeinflußt wurden. Als Kontrolle diente eine AIBA-freie Ration (ebenfalls 2 Gruppen mit jeweils 3 Ratten). Lediglich für das Arginin waren höhere Werte bei der Konzentration von 1.5% AIBA zu erkennen. Dies könnte auf die bereits beschriebene Hemmung der Arginaseaktivität (139) durch AIBA zurückzuführen sein. Somit dürfte feststehen, daß der im vorstehenden Versuch gefundene Einfluß von 0.5% AIBA auf die Plasmawerte aller Aminosäuren offensichtlich durch eine unbekannte Störung im Versuchsablauf zustande kam.

3. Ergebnisse

Die Aminosäurenkonzentration im Pfortaderplasma war nach Fütterung der hitzebehandelten Proben niedriger als nach Verabreichung der unerhitzten Kontrollproteine. Je nach verwendetem Protein und nach den Erhitzungsbedingungen waren die Unterschiede bei den einzelnen Aminosäuren verschieden deutlich.

Die meisten Informationen über die zunehmende Aminosäureschädigung bei steigenden Erhitzungstemperaturen vermittelte Versuch II, in dem die relativen Aminosäurenkonzentrationen 45 Minuten nach Fütterung der verschiedenen hoch erhitzten Testproteine festgestellt wurden. Wie aus den Ergebnissen dieses Versuches hervorgeht, kam es mit zunehmender Hitzebehandlung zu einem starken Abfall der Pfortaderwerte bei allen untersuchten Aminosäuren. Lediglich beim Phenylalanin, Tyrosin, Leucin und Isoleucin ist im Erhitzungsbereich von 115 bis 138°C dieser Abfall weniger deutlich.

Die Erhitzung des Sojaproteins auf 160°C bewirkte eine unerwartet hohe Aminosäureschädigung. Dies wird durch das Ergebnis von Versuch III, in dem die Aminosäurenkonzentrationen im Pfortaderblut zu verschiedenen Zeiten nach der Testmahlzeit gemessen worden waren, bestätigt. Nach Fütterung der bei 162°C erhitzten Proteine stiegen die Aminosäurenwerte kaum über die Nüchternkonzentration an und blieben weit unter der Aminosäurenanflutung beim nicht erhitzten Sojaprotein. Die relative Aminosäurenverfügbarkeit lag mit Werten von zumeist nur 10 - 30 % entsprechend niedrig.

Während das Ergebnis der Aminosäurenanalyse nach der Ionenaustauschchromatographie in krassem Widerspruch hierzu steht, stimmen die Befunde der übrigen am selben Material durchgeführten biologischen Versuche mit dem vorgenannten Urteil gut überein. Die Proteinverdaulichkeit bei Ratten (GUNSSER, 53) sowie Untersuchungen zur enzymatischen Hydrolyse der Proben mit verschiedenen Proteasen (OZDY, 100) und schließlich die eigenen Versuche mit wachsenden Ratten ließen dieselbe, von der Erhitzungsintensität beeinflusste Abstufung in der Proteinqualität erkennen. So lag z.B.

die scheinbare Proteinverdaulichkeit bei den auf 160°C erhitzten Proteinen nur noch in der Größenordnung von 10 - 20 %. Auch die Übereinstimmung der analysierten Gehaltswerte an verfügbarem Lysin mit den Plasmalysinwerten war sehr gut, während die Lysinbestimmung nach salzsaurer Hydrolyse, wie schon erwähnt, zu hohe Werte erbrachte.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse aller durchgeführten Versuche ganz deutlich, daß es in dem Erhitzungsbereich bis ca. 160°C mit zunehmender Hitzebehandlung zu einer immer stärker werdenden Aminosäureninaktivierung kommt, die sich auch in einem Abfall der Proteinverdaulichkeit äußert. Das Ausmaß der Zerstörung von Aminosäuren ist in diesem Bereich noch relativ gering. Tatsächlich treten die chemisch äußerst interessanten Reaktionen von Aminosäuren mit anderen Futterbestandteilen erst bei Temperaturen über 160°C (124, 125) auf. Die totale Aminosäurenzerstörung wird dann dominierend. Da die vorliegende Arbeit mehr die ernährungsphysiologischen Fragen der Proteinschädigung behandelt, wurde auf weitere Untersuchungen an noch höher erhitzten Proteinen verzichtet. Biologische Versuche zur physiologischen Charakterisierung der Aminosäureschädigung dürften bei Proteinen, die eine Erhitzung von mehr als 160°C (24 h) erlitten haben, wenig zusätzliche Informationen versprechen.

Die zusammen mit Öl erhitzten Proteine wiesen im Großen und Ganzen eine geringere Proteinqualität auf als die ohne Fett entsprechend erhitzten Chargen. Dies gilt vor allem für den Temperaturbereich bis 138°C und hier wieder bei den einzelnen Aminosäuren besonders für das Lysin und Methionin. (Cystin wurde nicht in die Untersuchungen einbezogen. Das Ausmaß der Cystinschädigung dürfte wesentlich von der Art der Bindung in der Proteinstruktur abhängig sein). Nach Untersuchungen von OZDY (100) am selben Material war die enzymatische Freisetzung von Lysin und Methionin aus dem zusammen mit Öl erhitzten Sojaprotein gegenüber dem ohne Öl hitzebehandelten Protein ebenfalls am stärksten beeinträchtigt. Auch der Gehalt an verfügbarem Lysin

(DNFB-Methode) war bei den zusammen mit Öl auf 115 - 138°C erhitzten Sojaproteinen signifikant gegenüber den Kontrollproteinen vermindert. Ähnlich bedingte Verluste haben auch andere Autoren während der Lagerung von Fischmehlen (72, 73) sowie nach übermäßiger Erhitzung von nicht entfetteten Soja- oder Erdnußmehlen festgestellt (2, 142). Weiterhin lassen sich Unterschiede in der Proteinqualität zwischen den mit und ohne Fett erhitzten Chargen auch hier aus dem Versuch mit wachsenden Ratten erkennen.

Bei den Versuchen zur Erhitzung von Casein zusammen mit Sojaöl wurden im Prinzip ähnliche Ergebnisse erhalten wie bei den Versuchen mit Sojaprotein. Die Erhitzung des Caseins zusammen mit oxidiertem Sojaöl im Luftstrom führte zu einer zusätzlichen Schädigung vor allem beim Arginin und Lysin. Bei Autoklavierung des Caseins waren diese Unterschiede zwischen den mit Sojaöl bzw. mit oxidiertem Sojaöl erhitzten Chargen nicht vorhanden. Auch die nach der DNFB-Methode ermittelte Verfügbarkeit des Lysins erbrachte keine Unterschiede.

In allen Versuchen mit Casein als Proteinträger wurden nach Fütterung des zusammen mit Öl im Luftstrom erhitzten Proteins nicht unbeträchtliche Mengen an Methioninsulfoxid im Pfortaderplasma nachgewiesen. Bei den Untersuchungen mit Sojaprotein traten dagegen nur Spuren von Methioninsulfoxid auf. Wenn das Casein zusammen mit oxidiertem Öl erhitzt worden war, ergab sich eine höhere Anflutung des Methioninsulfoxids als nach gleicher Behandlung mit nicht oxidiertem Öl. Bei den unter Stickstoff autoklavierten Proben konnte unabhängig vom Oxidationsgrad des Fettanteils jedoch kein Methioninsulfoxid festgestellt werden. Die Bildung von Methioninsulfoxid während der Erhitzung oder Lagerung von Futtermitteln in Gegenwart oxidierter bzw. oxidierender Fette scheint demnach von der Anwesenheit von ungebundenem Sauerstoff abhängig zu sein.

Diese Möglichkeit der Methioninschädigung wurde bereits früher im Zusammenhang mit Fischmehlen, die oxidierte Fette enthielten, von verschiedenen Autoren diskutiert (z. B. 72, 85, 87). Auch die Umwandlung von Methionin in

Methioninsulfoxid durch oxidierende Fette ist sowohl für das freie Methionin als auch für das proteingebundene Methionin nachgewiesen (134). Die ernährungsphysiologische Bedeutung von Methioninsulfoxid ist jedoch nicht nur auf Fischmehle oder Nahrungs- und Futtermittel, die oxidierende Fette enthalten, beschränkt. In der Nahrungsmittelindustrie wird z. B. Wasserstoffperoxid zur Konservierung von Milch und Milchprodukten oder zur Sulfhydrylgruppenoxidation in getrockneter Hefe bzw. bei Magermilch verwendet. Auch unter diesen Verhältnissen kann es unter Umständen zu ähnlichen Methioninschädigungen kommen.

Methioninsulfoxid kann wenigstens teilweise vom Organismus verwertet werden. Ein Zusatz von 0.1 % Methioninsulfoxid zu einer Methioninmangelration (10 % Casein als Proteinquelle) verbesserte die Net Protein Utilisation (NPU) von 76 auf 81 (88), während Ergänzung mit 0.1 % DL-Methionin die NPU sogar auf 95 anheb. Nach Untersuchungen von NJAA (98) sind verschiedene Isomere, nämlich D-, DL-, L-Methioninsulfoxid verglichen mit dem DL-Methionin zu 50, 70, 100 % verwertbar.

Beim peptidgebundenen Methionin ist die Oxidation zum Methioninsulfoxid ungünstiger zu beurteilen. Nach Untersuchungen von ELLINGER (36) mit *Streptococcus zymogenes* sowie mit wachsenden Ratten ist die Verfügbarkeit des an Casein gebundenen Methioninsulfoxids wesentlich geringer als die Verwertbarkeit des freien Methioninsulfoxids. Dies wäre dadurch zu erklären, daß durch die Veränderungen in der Struktur der Methioninseitenkette die enzymatische Freisetzung aus dem Proteinverband herabgesetzt wird.

In den vorliegenden Versuchen wurde jedoch eine Anflutung von Methioninsulfoxid im Pfortaderblut nachgewiesen. Es ist unwahrscheinlich, daß dieser nicht unbeträchtliche Anteil allein der Oxidation des freien Methionins entstammt. Eine enzymatische Freisetzung des Methioninsulfoxids aus dem Proteinverband dürfte demnach möglich gewesen sein, zumal die in Frage kommenden Peptidasen (Pepsin, Chymotrypsin, Ektopeptidasen) nicht so streng

substratspezifisch sind wie dies z. B. beim Trypsin der Fall ist.

Bei den übrigen Aminosäuren muß die Ursache für die Verminderung der Verfügbarkeit nach Hitzebehandlung hauptsächlich in der Bildung von enzymresistenten Bindungen gesehen werden. Bei Erhitzung von Proteinen allein kommt vor allem der epsilon-Aminogruppe des Lysins eine entscheidende Rolle zu, da mit ihr andere funktionelle Gruppen der Aminosäuren wie die Carboxyl- bzw. Amidgruppen reagieren und eine entsprechend feste Bindung eingehen können. Werden Proteine zusammen mit Fetten erhitzt, so werden zusätzlich noch Epoxide, Aldehyde und in weitaus größerem Maße Carbonylverbindungen (= Folgeprodukte der Fettoxidation) an verschiedene Aminosäuren gebunden. Auf die einzelnen Bindungsmöglichkeiten wurde bereits im Literaturteil dieser Arbeit ausführlich eingegangen.

Die Herabsetzung des Nährwerts von Proteinen nach Hitzebehandlung ist somit größtenteils in einer Depression der Proteinverdaulichkeit begründet. Die Verdauungsenzyme können die entsprechend veränderten Peptidketten nicht mehr spalten und die Aminosäuren nicht freisetzen. Nach Angaben verschiedener Autoren (7, 43, 44, 80, 110) können manche Peptidbruchstücke noch resorbiert werden. Die in ihnen enthaltenen Aminosäuren vermag der Organismus jedoch nicht zu nutzen, sodaß die Peptide zum Teil unverändert oder in umgewandelter Form wieder über die Niere ausgeschieden werden.

Nach BURACZEWSKI und Mitarbeitern kann es nach Fütterung von hitzegeschädigtem Protein zu einer Anhäufung von Zwischenprodukten der Proteinverdauung im Dünndarm kommen. Dadurch könnte die Aminosäurenresorption im Sinne einer Blockierung von Transportplätzen behindert werden (15, 16).

Mit zunehmender Temperaturbelastung und damit verminderter Proteinqualität des Futters ergab sich in Versuch II a und III eine scheinbare Beschleunigung der Magenentleerung. Eine umgekehrte Betrachtungsweise dürfte jedoch zutreffen-der sein, nämlich daß im Vergleich zum minderwertigeren, hitzegeschädigten Protein das besser für den Körper verwertbare Eiweiß den Magen langsamer verläßt. Dies um so mehr, als die Aktivität des Pylorus und z. T. auch die Magenperistaltik nur im Sinne einer Hemmung beeinflussbar sind.

Die einzigen bisher bekannten natürlich vorkommenden Reize für die Beschleunigung der Magenentleerung sind eine (un-physiologische) Stimulierung des Parasympathikus sowie die übermäßige Ausdehnung des Magens (63). Bei dem stark erhitzten Sojaprotein war jedoch die Quellung sogar wesentlich geringer als bei dem unbehandelten Eiweiß. Auch durch die geringe verabreichte Futtermenge wird ein derartiger Effekt unwahrscheinlich.

Die Öffnungsfrequenz des Pylorus wird vor allem über den enterogastralen Reflex und das Hormon Enterogastron gesteuert (57). Allerdings ist das Enterogastron vor allem bei der Verdauung von Fetten und Kohlenhydraten von Bedeutung. Die Produkte der Proteinverdauung, weiterhin Säuren und andere unspezifische Reizstoffe wirken dagegen anscheinend mehr über den sogenannten enterogastralen Reflex (138). Ausgelöst wird dieser Reflex durch die Reizung verschiedener Rezeptoren im Dünndarm. So vermuten SHARMA und NASSET (126), daß im Dünndarm neben den bekannten Rezeptoren für Fette sowie für die unterschiedliche Osmolarität und Wasserstoffionenkonzentration noch andere Chemorezeptoren vorkommen, die auf Glukose und verschiedene Aminosäuren ansprechen. PERAINO et al. (102) konnten durch abgestufte Zulagen von Casein zu einer fettarmen, protein-freien Diät eine Verzögerung der Magenentleerung feststellen. Nach PORTER und ROLLS (110) ist die Magenentleerung auch von der Art des Proteins abhängig. Casein und andere hochwertige Proteine verließen den Magen wesentlich langsamer als Gelatine. Nach CRIDER und WALKER (28) werden analog zur Wirkung der Glukose die Hungerkonzentration des

Magens nach einer intravenösen Infusion von Aminosäuren eingestellt. In den Versuchen von SCHARRER et al. (119) liefen höhere Aminosäurenkonzentrationen im Blut (über einen Zeitraum von 10 Stunden ermittelt) parallel mit einer verlangsamten Entleerung des Magens.

Aus dem Ergebnis der vorliegenden Untersuchungen läßt sich ebenfalls eine deutliche Beziehung der Magenentleerung zur Aminosäurenkonzentration im Pfortaderblut nach der Testmahlzeit erkennen (s. Tab. 16). Möglicherweise haben die (oder einige) freien Aminosäuren im (Pfortader-) Blut eine Signalfunktion auf die Magenentleerung im Sinne des von CRIDER und WALKER (28) diskutierten Regelkreises.

Tab. 16 Einfluß der Hitzebehandlung von Sojaprotein auf die Magenentleerung und die Konzentration an freiem Aminosäuren im Pfortaderplasma 45 Minuten nach der Testmahlzeit (Versuch 2a, ohne/mit Fett erhitzt)

Erhitzungs- temperaturen	95°C	115°C	125°C	138°C	160°C
Mageninhalt ⁺ (0.96 g T.S. pro Ratte = 100)	100/97	100/96	87/92	72/75	50/40
Aminosäurenkonz. ⁺ im Pfortaderplasma (1144 uMol/100 ml = 100)	100/93	98/84	86/82	76/69	31/34

⁺ Jede Gruppe = 4 Ratten, deren Mageninhalte bzw. Blut vereinigt wurden (s. S. 16).

D. ZUSAMMENFASSUNG

An verschieden stark hitzebehandelten Modellmischungen aus isoliertem Sojaprotein bzw. Casein mit Fett oder oxidiertem Fett wurden Untersuchungen zur analytischen und physiologischen Charakterisierung der Aminosäurenschädigung durchgeführt. Als Untersuchungskriterien dienten die Aminosäurenzusammensetzung der Testproteine sowie deren Gehalt an verfügbarem Lysin (DNFB-Methode). Weiterhin wurden Versuche mit wachsenden Ratten durchgeführt. Besonderer Wert wurde auf die Messung der Aminosäurenanflutung im Pfortaderplasma nach Fütterung der entsprechenden, hitzebehandelten Proben an hochproteinadaptierte, erwachsene Ratten gelegt. Die zu den verschiedenen Zeiten nach der Testmahlzeit ermittelten Konzentrationen an freien Aminosäuren im Pfortaderblut wurden zur Berechnung des Ausmaßes der Aminosäurenschädigung herangezogen. In allen Fällen wurden die unerhitzten oder die ohne Fett hitzebehandelten Proben als Kontrollen in die Untersuchungen einbezogen.

Nach Fütterung der hitzebehandelten Proteine wurden wesentlich niedrigere Aminosäurenkonzentrationen im Pfortaderblut erhalten als nach Fütterung der unerhitzten Proben. Diese Verringerung der Aminosäurenanflutung wurde mit steigenden Erhitzungstemperaturen immer gravierender. So wurden beispielsweise 45 Minuten nach Verabreichung von Proben, die bei 95°, 115°C, 125°C, 138° und 160°C erhitzt worden waren, Lysinkonzentrationen von 96, 84, 71, 58 und 32 µMol pro 100 ml Plasma (Nüchternkonzentration = 32 µMol/100 ml) gemessen. Nach Fütterung des auf 160°C erhitzten Sojaproteins kam es für alle Aminosäuren nur noch zu einem äußerst geringen Anstieg der Konzentrationen über den Nüchternwert. Biologische Versuche zur Beurteilung der Aminosäurenschädigung scheinen daher über eine Erhitzungstemperatur von 160°C hinaus wenig zusätzliche Informationen zu versprechen.

Bei den zusammen mit Fett erhitzten Proteinen (Sojaprotein und Casein) war die Aminosäurenschädigung stärker ausgeprägt als bei den ohne Fett hitzebehandelten Vergleichsproben. Dies galt besonders für den Temperaturbereich von

115 - 138°C und bei den einzelnen Aminosäuren, in erster Linie für das Lysin und Methionin. Die Erhitzung des Caseins zusammen mit oxidiertem Öl im Luftstrom hat möglicherweise zusätzliche Schädigungen, vor allem beim Lysin und Arginin, zur Folge gehabt. Bei Autoklavierung von Casein unter Stickstoff traten diese Unterschiede zwischen den allein, zusammen mit Fett oder zusammen mit oxidiertem Fett erhitzten Proteinen jedoch nicht auf.

Nach der Testmahlzeit des zusammen mit Fett im Luftstrom erhitzten Caseins wurde im Pfortaderblut Methioninsulfoxid nachgewiesen. Bei Fütterung von Casein, das zusammen mit oxidiertem Öl erhitzt worden war, ergaben sich höhere Gehalte, während bei den unter Stickstoff autoklavierten Proben unabhängig vom Oxidationsgrad des Fettanteils kein Methioninsulfoxid festgestellt werden konnte.

Unbehandeltes Sojaprotein verließ den Magen wesentlich langsamer als das hitzegeschädigte, in seiner Aminosäurenverfügbarkeit beeinträchtigte Eiweiß. Es zeigte sich hierbei eine deutliche Beziehung zwischen dem Mageninhalt (Trockensubstanz) und der Konzentration freier Aminosäuren im Pfortaderplasma. Die Beeinflussung der Magenentleerung im Sinne eines Regelkreises durch Abbauprodukte der Proteine im Dünndarm oder durch die Konzentration freier Aminosäuren im Blut wird diskutiert.

SUMMARY

Isolated soybean protein or casein were subjected alone, or together with fat or with oxidized fat to different conditions of heat treatment. In all samples the amino acid composition and the contents of fluordinitrobenzene-available lysine were determined. Using a special technique, the concentration of free amino acids in the portal blood of rats has been estimated after one single meal of the test protein. The rats have previously been adapted to high protein diets. Since this conditioning of rats give rise to high concentrations of free amino acids in the

plasma, a lowered amino acid availability due to heat damage of proteins can be detected.

The amino acid concentrations in the portal vein dropped with increasing temperatures of the heat treatment. After feeding a severely heated soybean protein (160°C), the concentrations of all amino acids rose only slightly above the level achieved after starvation. Therefore, it is concluded, that biological tests for determining the damage to amino acids caused by temperatures above 160°C seem to provide limited information.

There was a greater damage of amino acids when the protein was heated together with fat, as compared to the other samples which received the heat treatment without any fat content. This was especially found within the temperature range of 115-138°C, where lysine and methionine proved to be most affected. The heat treatment of casein together with oxidized oil in open air possibly caused an additional damage above all to lysine and argine. All these variations did not exist when casein was autoclaved in the presence of nitrogene, either alone or combined with fat, or with oxidized fat.

After a test meal containing casein, which was heat treated together with fat in open air, methionine-sulfoxides appeared in the portal blood. After feeding casein, which was heated together with oxidized oil, a higher content was achieved; but from the autoclaved samples, independent from the oxidation degree of the fat portion, no methionine-sulfoxides were obtained.

Untreated sojaprotein passed the stomach at a slower rate than that which was damaged by heat, in which the availability of amino acids was reduced. An obvious correspondence exists between the stomach content (dry matter) and the concentration of free amino acids in the portal blood. Thus the influence upon the stomach emptying according to a feed-back mechanism due to the constituents of proteins in the small intestine or due to the concentrations of free amino acids in the blood is debated.

E. LITERATURVERZEICHNIS

1. ALMQUIST, H.J., H.L. CHRISTENSEN, S. MAURER
Sulfid liberation from raw soybean protein.
Proc.Soc.Expt.Biol.Med. 122, 913 (1966)
2. ANANTHARAMAN, K., K.J. CARPENTER
Effects of heat processing on the nutritional
value of groundnut products. I. Protein
quality of groundnut cotyledons for rats.
J.Sci.Fd.Agric. 20, 703 (1969)
3. ANDREWS, J.S., F.J. BJORKSTEN, B.F. TRENK, A.S. HENICK,
R.B. KOCH
The reaction of an autoxidized lipid with
proteins.
J.Am.Oil Chemists' Soc. 42, 779 (1965)
4. ANDREWS, J.S., W.H. GRIFFITH, J.F. MEAD, R.A. STEIN
Toxicity of air-oxidized soybean-oil.
J.Nutr. 70, 199 (1960)
5. BENSON, A.A.
On the orientation of lipids in chloroplast
and cell membranes.
J.Am.Oil Chemists' Soc. 43, 265 (1966)
6. BJARNASON, J., K.J. CARPENTER
Mechanisms of heat damage in proteins.
1. Models with acylated lysine units.
Br.J.Nutr. 23, 859 (1969)
7. BJARNASON, J., K.J. CARPENTER
Mechanisms of heat damage in proteins.
2. Chemical changes of pure proteins.
Br.J.Nutr. 24, 313 (1970)
8. BLOCK, R.J., H.H. MITCHEL
The correlation of the amino-acid-composition
of proteins with their nutritive value.
Nutr.Abstr.Rev. 16, 249 (1946)
9. BOGNAR, A. Einfluß der thermischen Behandlung auf den
Gehalt an Aminosäuren in Rindfleisch.
Ernährungs-Umschau 2, 200 (1971)
10. BOWMAN, D.E.
Fractions derived from soybeans and navy
bean which retard tryptic digestion of casein.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 57, 139 (1944)
11. BRAUDE, R., K.G. MITCHELL, A.W. MYRES, J.W.G. PORTER,
A.P. WILLIAMS
Amino acid levels in bloodplasma of growing
pigs given diets supplemented with lysine.
Proc.Nutr.Soc. 28, 40 A (1969)

12. BRÜGGEMANN, J., H. ERBERSDOBLER
Untersuchungen zur analytischen und physio-
logischen Charakterisierung der Aminosäuren-
schädigung bei Hitzebehandlung von Nahrungs-
und Futtermitteln.
1. Mitt. Einleitung und Untersuchung an
Modellgemischen
Z.Tierphysiol.Tierern.Futtermittelkde. 24,
55 (1968)
13. BURACZEWSKI, S.
Factors affecting amino acids in the blood.
Thesis, Reading (1966)
14. BURACZEWSKI, S., L. BURACZEWSKA, J.E. FORD
The influence of heating of fish proteins
on the course of their digestion.
Acta biochem.polon. 14, 121 (1967)
15. BURACZEWSKI, S., J.W.G. PORTER, D.R. WESTGARTH,
A.P. WILLIAMS
Relationship between the composition of
dietary proteins and the changes in blood
plasma amino acid levels after a single meal
containing a protein.
Proc.Nutr.Soc. 26, viii (1967)
16. BURACZEWSKI, S., J.W.G. PORTER, A.P. WILLIAMS
Blood amino acid levels and the course of
digestion in rats of native and heat-damaged
cod muscle protein.
Proc.7th.Int.Congress Nutr. Hamburg 5,
95 (1966)
17. BUTTKUS, H. Reaction of cysteine and methionine with
malonaldehyde.
J.Am.Oil Chemists' Soc. 46, 88 (1969)
18. CARPENTER, K.J., G.M. ELLINGER
The estimation of the available lysine in
animal protein foods.
Biochem.J. 77, 604 (1960)
19. CARPENTER, K.J., C.H. LEA, L.J. PARR
Chemical and nutritional changes in stored
herring meal.
4. Nutritional significance of oxidation
of the oil.
Br.J.Nutr. 17, 151 (1963)
20. CARPENTER, K.J., J.L. L'ESTRANGE, C.H. LEA
Effects of moderate levels of oxidized fat
in animal diets under controlled conditions.
Proc.Nutr.Soc. 25, 25 (1966)

21. CARPENTER, K.J., B.E. MARCH, C.K. MILNER, R.C. CAMPBELL
A growth assay with chickens for the lysine content of protein concentrates.
Br.J.Nutr. 17, 309 (1963)
22. CARPENTER, K.J., C.B. MORGAN, C.H. LEA, L.J. PARR
Chemical and nutritional changes in stored herring meal.
3. Effect of heating at controlled moisture contents on the binding of amino acids in freeze-dried herring press cake and related model systems.
Br.J.Nutr. 16, 451 (1962)
23. CHIPAULT, J.R., J.M. HAWKINS
Lipid autoxidation in freeze-dried meats.
J.Agr.Food Chem. 19, 495 (1971)
24. CHRISTENSEN, H.N., H. AKEDO, D.L. OXENDER, C.G. WINTER
On the mechanism of amino acid transport into cells.
Amino Acid Pools. Elsevier Publishing Company (1962)
25. CHRISTENSEN, H.N., A.J. ASPEN, E.G. RICE
Metabolism in the rat of three amino acids lacking alpha-hydrogen.
J.Biol.Chem. 220, 287 (1956)
26. CLANDININ, D.R.
The effects of methods of processing on the nutritive value of herring meals.
Pault.Sci. 28, 128 (1949)
27. COMBS, G.F. zit. n. Feedstuffs 25.3.1967
28. CRIDER, R.J., S.M. WALKER
Effect of intravenously administered amino acids on the stomach of a woman with a gastric fistula.
Arch.Surg. 57, 10 (1948)
29. DAMMERS, J. Das Verhalten der Aminosäuren während der Eiweißverdauung beim Schwein.
Z.Tierphysiol.Tierern.Futtermittelkde. 22, 64 (1967)
30. DE GROOT, A.P., P. SLUMP
Effects of severe alkali treatment of proteins on amino acid composition and nutritive value.
J.Nutr. 98, 45 (1969)

31. DENTON, A.E., C.A. ELVEHJEM
Amino acid concentration in the portal
vein after digestion of amino acid.
J.Biol.Chem. 206, 455 (1954)
32. DENTON, A.E., C.A. ELVEHJEM
Availability of amino acids in vivo.
J.Biol.Chem. 206, 449 (1954)
33. Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft
DGF-Einheitsmethoden C-VI-6a (61)
34. DÜMMER, H.W. Untersuchungen zur Aminosäurenverfügbarkeit
bei hitzegeschädigten Proteinen.
1. Erhitzung von Proteinen allein und mit
Glukose
Med.vet.Diss. München (1970)
35. ELDRED, N.R., G. RODNEY
The effect of proteolytic enzymes on raw
and heated casein.
J.Biol.Chem. 162, 261 (1946)
36. ELLINGER, G.M., R. PALMER
The biological availability of methionine
sulfoxide.
Proc.Nutr.Soc. 28, 42 A (1969)
37. ERBERSDOBLER, H.
Die Bestimmung von verfügbarem Lysin in
Eiweißfuttermitteln mit Hilfe von Dinitro-
fluorbenzol.
Med.vet.Diss. München (1963)
38. ERBERSDOBLER, H.
Untersuchungen zur analytischen und physio-
logischen Charakterisierung der Aminosäuren-
schädigung bei Hitzebehandlung von Nahrungs-
und Futtermitteln.
Habilitationsschrift München (1967)
39. ERBERSDOBLER, H.
Aminosäurenanflutung im Pfortaderplasma
nach Fütterung hitzegeschädigten Proteins
an hocheiweißadaptierte Ratten.
Z.Tierphysiol.Tierern.Futtermittelkde. 25,
119 (1969)

40. ERBERSDOBLER, H., H. DÜMMER, H. ZUCKER

Untersuchungen zur analytischen und physiologischen Charakterisierung der Aminosäurenschädigung bei Hitzebehandlung von Nahrungs- und Futtermitteln.

2. Mitt. Der Einfluß der Aminosäurenverfügbarkeit auf die Anflutung freier Aminosäuren im Pfortaderplasma.

Z.Tierphysiol.Tierern.Futtermittelkde. 24, 136 (1968)

41. ERBERSDOBLER, H., H. ZUCKER

Zur Bestimmung von verfügbarem Lysin in Futtermitteln mit Dinitrofluorbenzol.

Z.Tierphysiol.Tierern.Futtermittelkde. 19, 189 (1964)

42. EVANS, R.J., H.A. BUTTS

Inactivation of amino acids by autoclaving Science 109, 569 (1949)

43. FORD, J.E.

A microbiological method for assessing the nutritional value of proteins.

3. Further studies on the measurement of available amino acids.

Br.J.Nutr. 18, 449 (1964)

44. FORD, J.E., C. SHORROCK

Metabolism of heat-damaged protein in the rat. Influence of heat-damage on the excretion of amino acids and peptides in the urine.

Br.J.Nutr. 26, 311 (1971)

45. GANAPATHY, S.M., E.S. NASSET

Free amino acids in dog blood and gut content after feeding meat.

(J.Nutr. 78, 241 (1962)

46. Gesellschaft für Ernährungsphysiologie der Haustiere
Arbeitskreis für Proteinbewertung

Vorschrift zur Proteinbewertung in Versuchen mit wachsenden Ratten.

Z.Tierphysiol.Tierern.Futtermittelkde. 19, 305 (1964)

47. GITLER, C.

Protein digestion and absorption in nonruminants.

In: H.N. MUNRO and J.B. ALLISON

"Mammalian Protein Metabolism"

Academic Press New York - London

Vol. I 35-70 (1964)

48. GOLDBERG, A., K. GUGGENHEIM

The digestive release of amino acids and their concentrations in the portal plasma of rat after protein feeding.
Biochem. J. 83, 129 (1962)

49. GREAVES, E.O., A.F. MORGAN, M.K. LOVEEN

The effect of amino-acid supplements and of variations in temperature and duration of heating upon the biological value of heated casein.
J.Nutr. 16, 115 (1938)

50. GREENSTEIN, J., A. WINITZ

The chemistry of amino acids
John Wiley and Sons, Inc. New York
Vol. 1, 2, 3 (1961)

51. GUGGENHEIM, K., S. HALEVY, N. FRIEDMAN

Levels of lysine and methionine in portal blood of rats following protein feeding.
Arch.Biochem.Biophys. 91, 6 (1960)

52. GULINSKY, E.

Pflanz. und Tier. Fette und Öle.
Vincentz Hannover 43-52 (1963)

53. GUNSSER, I. Med.vet.Diss. München (in Vorbereitung)

54. GUPTA, J.D., A.M. DAKROURY, A.E. HARPER, C.A. ELVEHJEM

Biological availability of lysine.
J.Nutr. 64, 259 (1958)

55. GUTTRIDGE, D.G.A., D. LEWIS

Chick bioassay of methionine and cystine.
1. Development of assay procedure.
Br.Poult.Sci. 5, 99 (1964)

56. GUTTRIDGE, D.G.A., D. LEWIS

Chick bioassay of methionine and cystine.
2. Assay of soyabean meals, groundnut meals, meat meals, methionine isomers and methionine analogue.
Br.Poult.Sci. 5, 193 (1964)

57. GUYTON, A.C.

Basic human physiology: Normal function and mechanisms of disease.
W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto (1971)

58. HARRISON, D.G., D.E. BEEVER, D.J. THOMSON
The occurrence of alpha-amino-isobutyrate
in sheep digesta.
Proc.Nutr.Soc. 30, 16 A (1971)
59. HEYNS, K., H. PAULSEN
Über die chemischen Grundlagen der Maillard-
Reaktion.
Wiss.Veröffentl.d.Deutsch.Ges.f.Ernährung
"Veränderung der Nahrung durch industrielle
und haushaltsmäßige Verarbeitung"
Dr. Dietrich Steinkopf Verlag, Darmstadt
(1960) S. 15
60. HOCK, H., H. KROPP
Autoxidation von Kohlenwasserstoffen und
die Cumol-Phenol-Synthese.
Angew. Chemie 69, 313 (1957)
61. HOLM, U., K. EKBOM, G. WODE
Determination of the extent of oxidation
of fats.
J.Am.Oil Chemists' Soc. 34, 606 (1957)
62. HORN, M.J., D.B. JONES, S.J. RINGEL
Isolation of a new sulfur-containing amino
acid (lanthionine) from sodium carbonate-
treated wool.
J.Biol.Chem. 138, 141 (1941)
63. HUNT, J.N., M.T. KNOX
Regulation of gastric emptying.
In: Handbook of physiology, Section 6, Vol.IV,
p. 1917
Am.Physiol.Soc.Washington DC (1968)
64. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)
Standard Methods of the Oils and Fats
Division of the IUPAC, 5. Aufl. London:
Butterworths (1964)
I. Suppl. ebenda (1966)
65. JAFFE, W.G., C.L. VEGA LETTE
Heat labile growth-inhibiting factors in beans.
(J.Nutr. 24, 203 (1968)
66. JAKOBSEN, P.E.
Bewertung der Proteinstoffe in Futtermitteln
für Schweine und Hühner.
Z.Tierphysiol.Tierern.Futtermittelkde. 20,
168 (1965)

67. JERVIS, E.L., D.J. SMYTH

The effect of concentrations of amino acids on their rate of absorption from the intestine. J.Physiol.(London) 149, 433 (1959)

68. KENNER, G.W., R.C. SHEPPARD

Alpha-aminoisobutyric acid, beta-hydroxy-leucin and gamma-methylprolin from hydrolysis of a natural product. Nature 181, 48 (1958)

69. KNIGHT, H.B., J.E. COLEMAN, D. SWERN

Reactions of fatty materials with oxygen. IX.Analytical study of the autoxidation of methyl oleate. J.Am.Oil.Chemists'Soc. 28, 498 (1951)

70. KREIENBRING, F.

Zu einigen Problemen der sauren Hydrolyse von Futtermitteln. Wiss.Z.Uni.Rostock 18/II, 189 (1969)

71. LANG, K., E.H. von JAN, J. HENSCHEL

Über die ernährungsphysiologischen Eigenschaften von Fisch-Frittierfetten. 1. Mitt. Einfluß des Frittierens auf chemische Zusammensetzung und Futter-Efficiency. Z.Ernährungswissenschaft 9, 363 (1969)

72. LEA, C.H., L.J. PARR, K.J. CARPENTER

Chemical and nutritional changes in stored herring meal. Br.J.Nutr. 12, 297 (1958)

73. LEA, C.H., K.J. CARPENTER

Chemical and nutritional changes in stored herring meal. Br.J.Nutr. 14, 91 (1960)

74. LEPKOVSKY, S., F. FUTURA, M.K. DIMICK

Trypsin inhibitor and the nutritional value of soyabeans. Br.J.Nutr. 25, 235 (1971)

75. LEWIS, S.E., E.D. WILLS

The destruction of -SH groups of protein and amino acids by peroxides of unsaturated fatty acids. Biochem.Pharmacol. 11, 901 (1962)

76. LONCENECKER, J.B., N.L. HAUSE
Relationship of plasma amino acids and composition of the ingested protein.
Arch.Biochem.Biophys. 84, 46 (1959)
77. LUNDBERG, W.O., P. JÄRVI
Peroxidation of polyunsaturated fatty compounds.
In: Progress in the chemistry of fats and other lipids.
Pergamon Press Vol. IX, 3, 379 (1968)
78. MARECKOVA, O., J. VAVRIKOVA, J. POKORNY, H. VAVRIKOVA
Die biologische Bedeutung von Komplexen oxydierter Lipide mit Eiweiß.
4. Mitt. Die enzymatische Hydrolyse der Eiweißkomponente in vivo.
Nahrung 12, 769 (1968)
79. MATTEWS, D.M., G. WISEMAN
Transamination by the small intestine of the rat.
J.Physiol. 120, 55 (1953)
80. MAURON, J. Le comportement chimique des protéines lors de la préparation des aliments et ses incidences biologiques.
J.Int.Vitaminol. 40, 209 (1970)
81. Mc LAUGHLAN, J.M., W.J. ILLMAN
Use of free plasma amino acid levels for estimating amino acid requirements of the growing rat.
J.Nutr. 93, 21 (1967)
82. MECHAM, D.K., M.S. OLCOTT
Effect of dry heat on proteins.
Ind.Engng.Chem. 39, 1023 (1947)
83. MEYER, E.W. Soy protein concentrates and isolates.
Proc.Int.Conference of Soybean Protein Foods A.R.S.-71-35 (1967)
84. MILNER, C.K., K.J. CARPENTER
Effect of wet heat-processing on the nutritive value of whole-wheat-protein.
Cereal Chem. 46, 425 (1969)
85. MILLER, E.L., K.J. CARPENTER, C.B. MORGAN, A.W. BOYNE
Availability of sulphur amino acids in protein foods. 2. Assessment of available methionine by chick and microbiological assays.
Br.J.Nutr. 19, 249 (1965)

86. MILLER, E.L., K.J. CARPENTER, C.K. MILNER

Availability of sulfur amino acids in protein foods. 3. Chemical and nutritional changes in heated cod muscle.
Br.J.Nutr. 19, 547 (1965)

87. MILLER, E.L., A.W. HARTLEY, D.C. THOMAS

Availability of sulfur amino acids in protein foods. 4. Effect of heat treatment upon the total amino acids content of cod muscle.
Br.J.Nutr. 19, 565 (1965)

88. MILLER, D.S., P. SAMUEL

Methionine sparing compounds.
Proc.Nutr.Soc. 27, 21A (1968)

89. MOHAMMAD, A., H.S. OLCOTT, H. FRAENKEL-CONRAT

The reaction of proteins with acetaldehyde.
Arch.Biochem. 24, 270 (1949)

90. NARAYAN, K.A., F.A. KUMMEROW

Complexes between oxidized lipids and proteins.
J.Am.Oil Chemists'Soc. 40, 339 (1963)

91. NARAYAN, K.A., M. SUGAI, F.A. KUMMEROW

Complex formation between oxidized lipids and egg albumin.
J.Am.Oil Chemists'Soc. 41, 254 (1964)

92. NASSET, E.S.

The nutritional significance of endogenous nitrogen secretions in non-ruminants.
In: The Role of Gastrointestinal Tract in Protein Metabolism.
Oxford: Blackwell p. 83-116 (1964)

93. NASSET, E.S., S.N. GANAPATHY, D.P.S. GOLDSMITH

Amino acids in dog blood and gut contents after feeding zein.
J.Nutr. 81, 343 (1963)

94. NASSET, E.S., R. SCHWARTZ, H.V. WEISS

The digestion of proteins in vivo.
J.Nutr. 56, 83 (1955)

95. NEAME, K.D., G. WISEMAN

The transamination of glutamic and aspartic acids during absorption by the small intestine of the dog in vitro.
J.Physiol. 135, 442 (1957)

96. NEY, K.H. Veränderungen an Fettsäuremethylestern unter oxydativen und thermischen Einflüssen.
1. Welt-Fett-Kongress
Aschendorfer Verlagsbuchhandlung Münster, Westf., S.98 (1964)
97. NEY, K.H. Veränderungen an Fettsäuremethylestern unter oxydativen und thermischen Einflüssen, Fette, Seifen, Anstrichmittel 67, 190 (1965)
98. NJAA, L.R. Utilization of methionine sulphoxide and methionine sulphone by the young rat.
Br.J.Nutr. 16, 571 (1962)
99. OLMSTED, W.W., E.S. NASSET, M.L. KELLY jr.
Amino acids in postprandial gut contents of man.
J.Nutr. 90, 291 (1966)
100. OZDY, D. Med.vet.Diss. München (in Vorbereitung)
101. PARDUN, H. Analyse der Fette und Fettbegleitstoffe.
In: Fette und Lipide
Handbuch der Lebensmittelchemie
Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York 4, 297 (1969)
102. PERAINO, C., Q.R. ROGERS, M. YOSHIDA, M.L. CHEN, A.E. HARPER
Observations on protein digestion in vivo.
II. Dietary factors affecting the rate of disappearance of casein from the gastrointestinal tract.
Canad.J.Biochem. 37, 1475 (1959)
103. PION, R., G. FAUCONNEAU, A. RERAT
Variations in portal amino-acid levels in the course of digestion in the pig.
In: The Role of the Gastrointestinal Tract in Protein Metabolism.
Blackwell Scientific Publications Oxford p. 309 (1964)
104. PION, R., G. FAUCONNEAU, A. RERAT
Étude de la digestion des protéines chez le porc par la mesure de l'aminoacidémie porte
In: Amino acides, peptides, protéines
6, 327 (1966)
Société de Chimie Organique et Biologique Paris
105. POKORNY, J., G. JANICEK
Reaktion oxydierter Lipide mit Eiweißstoffen.
4. Mitt. Die Bindung oxydierter Lipide an Casein.
Nahrung 12, 81 (1968)

106. POKORNY, J., S. KLEIN, M. ZELINKOVA
Reaktionen oxydierter Lipide mit Eiweiß-
stoffen.
3. Mitt. Reaktion von Albumin mit Hydroxyketo-
stearinsäuren.
Nahrung 11, 121 (1967)
107. POKORNY, J., S. KLEIN, J. KOREN
Reaktionen oxydierter Lipide mit Eiweiß-
stoffen.
2. Mitt. Reaktion von Albumin mit
Epoxyderivaten
Nahrung 10, 321 (1966)
108. POKORNY, J., J. VAVRIKOVA, O. MARECKOVA
Die biologische Bedeutung von Komplexen
oxydierter Lipide mit Eiweiß.
1. Mitt. Einführung in die Problematik
und die Methodik.
Nahrung 12, 655 (1968)
109. POKORNY, J., H. ZWAIN, G. JANICEK
Reaktionen oxydierter Lipide mit Eiweiß-
stoffen.
1. Mitt. Extrahierbarkeit der Komplexe
oxydierter Fette mit Polyamid in Gegenwart
von Wasser.
Nahrung 10, 315 (1966)
110. PORTER, J.W.G., B.A. ROLLS
Some aspects of the digestion of proteins.
Proc.Nutr.Soc. 30, 17 (1971)
111. PORTER, J.W.G., A.P. WILLIAMS
Quality of dietary and amino acid blood
levels.
Biochem.J. 87, 7 (1963)
112. RINIKER, B., H. BRUNNER, R. SCHWYZER
Beta-Asp, Val-Hypertensin II, ein Hyperten-
sin-Analoges besonders hoher biologischer
Aktivität.
Angew.Chem. 74, 469 (1962)
113. RIOS-IRIARTE, B.J., R.H. BARNES
The effect of overheating on certain
nutritional properties of the protein
of soybeans.
Food Technol. 20, 835 (1966)
114. ROUBAL, W.T., A.L. TAPPEL
Damage to proteins enzymes and amino acids
by peroxidizing lipids.
Arch.Biochem.Biophys. 113, 5 (1966)

115. ROUBAL, W.T., A.L. TAPPEL
Polymerization of proteins induced by
freeradical lipid peroxidation.
Arch.Biochem.Biophys. 113, 150 (1966)
116. SANGER, F.
The free amino groups of insulin.
Biochem.J. 39, 507 (1945)
117. SALLMANN, H.-P.
Über den Einsatz von Antioxydantien in der
Tierernährung. Bilanzstudie mit 2,6
Ditertiär-butylhydroxyl-toluol (BHT) am
Geflügel.
Med.vet.Diss. München (1965)
118. SCHARRER, E.
Untersuchungen über die kausalen Vorausset-
zungen des Verzehrsrückganges bei protein-
reicher Ernährung.
Med.vet.Diss. München (1965)
119. SCHARRER, E., H. ERBERSDOBLER, H. ZUCKER
Untersuchungen über den Verzehrsrückgang
bei proteinreicher Ernährung.
2. Beziehungen zwischen Futterverzehr und
freien Aminosäuren im Plasma nach unterschied-
licher Adaptation an proteinreiche Fütterung.
Z.Tierphysiol.Tierern.Futtermittelkde. 22,
265 (1967)
120. SCHARRER, E.
Nahrungszusammensetzung und Aminosäuren-
resorption.
Wiss.Z.Uni.Rostock 18/I, 129 (1969)
121. SCHORMÜLLER, J., E. GRAMPP, H.-D. BELITZ
Veränderungen an Milchproteinen durch Ein-
wirkung von Carbonylverbindungen.
1. Mitt. Reaktion von Casein mit Athanal
Z.Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung
136, 271 (1968)
122. SCHORMÜLLER, J., GRAMPP, H.-D. BELITZ
Veränderungen an Milchprodukten durch Ein-
wirkung von Carbonylverbindungen.
2. Mitt. Veränderungen an Membranproteinen
von schaum- und sprühgetrockneter Vollmilch
bei Lagerung.
Z.Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung
137, 65 (1968)
123. SEGAL, S. Hormones, amino-acid transport and protein
synthesis.
Nature 203, 17 (1964)

124. SEVERIN, T. Persönliche Mitteilung 1971
125. SEVERIN, T. Bildung von Benzaldehyd aus Phenylalanin und N-Acetylphenyl-äthylamin beim Erhitzen unter Einwirkung von Luft.
Z. Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung 144, 321 (1970)
126. SHARMA, K.N., N.S. NASSET
Electrical activity in mesenteric nerves after perfusion of gut lumen.
Am.J.Physiol. 202, 725 (1962)
127. SLUMP, P. Characterization of the nutritive value of food proteins by amino acid composition and the effect of heat and alkali treatment on the quality of amino acids.
Thesis, Amsterdam (1969)
128. SMITH, R.E. Use of aminoisobutyric acid as an internal indicator in chick plasma amino acid studies.
J.Nutr. 89, 276 (1966)
129. SMITH, R.E. Assessment of the availability of amino acids in fish meal, soybean meal and feather meal by chick growth assay.
Poult. Sci. 47, 1624 (1968)
130. SMITH, R.E., H.M. SCOTT
Measurement of amino acid content of fish meal proteins by chick growth assay.
1. Estimation of amino acid availability in fish meal proteins before and after heat treatment.
Poult.Sci. 44, 401 (1965)
131. SMITH, R.E., H.M. SCOTT
Use of free amino acid concentrations in blood plasma in evaluating the amino acid adequacy of intact proteins for chick growth.
1. Free amino acid patterns of blood plasma of chicks fed unheated and heated fish meal proteins.
J.Nutr. 86, 37 (1965)
132. SMITH, R.E., H.M. SCOTT
Use of free amino acid concentrations in blood plasma in evaluating the amino acid adequacy of intact proteins for chick growth.
2. Free amino acid patterns of blood plasma of chicks fed sesame and raw, heated and overheated soybean meals.
J.Nutr. 86, 45 (1965)

133. SPACKMAN, D.H., W.H. STEIN, S. MOORE
An automatic recording apparatus for use
in the chromatography of amino acids.
Analyt.Chem. 30, 1190 (1958)
134. TANNENBAUM, S.R., H. BARTH, J.P. LE ROUX
Loss of methionine in casein during storage
with autoxidizing methyl linoleat.
J.Agr.Food Chem. 17, 1353 (1969)
135. TAPPEL, A.L.
The mechanism of the oxidation of un-
saturated fatty acids catalyzed by hematin
compounds.
Arch.Biochem.Biophys. 44, 378 (1953)
136. TAPPEL, A.L.
Studies of the mechanism of vitamin E action.
3. In vitro copolymerization of oxidized
fat with protein.
Arch.Biochem.Biophys. 54, 266 (1955)
137. TAPPEL, A.L.
Freeze-dried meat.
2. The mechanism of oxidative deterioration
of freeze-dried beef.
Food Res. 21, 195 (1956)
138. THOMAS, J.E.
Mechanics and regulation of gastric emptying.
Physiol.Rev. 37, 453 (1957)
139. TSANG-CHEN SHAO, D.C. HILL
Effect of alpha-aminoisobutyric acid on
arginine metabolism in chicks.
J.Nutr. 98, 225 (1969)
140. VALLE-NESTRA, J., R.H. BARNES
Digestion of heat-damaged egg albumin by
the rat.
J.Nutr. 100, 873 (1970)
141. VANDENHEUVEL, F.A.
Lipid-protein interactions and cohesive
forces in the lipoprotein systems of
membranes.
J.Am.Oil Chemists'Soc. 43, 258 (1966)
142. VARELA, G., O. MOREIRAS-VARELA, C. VIDAL, A. MURILLO,
J.A. LUQUE
Influence of sucrose and protecting action
of moisture and fat on the quality of the
protein of ground nuts during toasting.
Proc.Nutr.Soc. 27, 25A (1968)

143. VENOLIA, A.W., A.L. TAPPEL

Brown coloured oxypolymeres of unsaturated
fats.
J.Am.Oil Chemists'Soc. 35, 135 (1958)

144. WEDEMEYER, G.A., M. DOLLAR

Co-oxidation of sulfur-containing amino
acids in an autoxidizing lipid system.
J.Food Sci. 28, 537 (1963)

Nach Beendigung meiner Arbeit möchte ich
Herrn Prof. DDr.DDr.h.c. Johs. Brüggemann
für die Überlassung des Themas sowie für
die sehr guten Arbeitsbedingungen in seinem
Institut herzlich danken.

Herrn Universitätsdozent Dr. Helmut Erbersdobler
gilt mein besonderer Dank für die mir jederzeit
gewährte Förderung und Anregung meiner Arbeit.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei für die
Gewährung von Sachmitteln zur Durchführung
dieses Forschungsvorhabens gedankt.

LEBENS LAUF

Am 15. April 1944 wurde ich, Gunther Weber, als Sohn des Juristen und Volkswirtes Hans Weber und dessen Ehefrau Elisabeth, geborene Birkhofer, in Püssensheim/Marienhof, Kreis Kitzingen, geboren.

Von 1950 - 1955 besuchte ich die Volksschule in Püssensheim und trat dann in die Oberrealschule Scheinfeld über. Nach Wechsel in die Röntgenoberrealschule Würzburg (1957), legte ich an dieser Schule im Juli 1964 die Reifeprüfung ab.

Den Grundwehrdienst leistete ich als Wehrpflichtiger von 1964 - 1965 in der Bundesrepublik Deutschland.

Im Sommersemester 1966 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München mit dem veterinärmedizinischen Studium und schloß dieses im Februar 1971 mit dem Staatsexamen ab.

Die Bestallung als Tierarzt wurde mir im März 1971 erteilt.

BAMBERGER FOTODRUCK. RUDOLF RODENBUSCH

8800 BAMBERG · Pöldorferstr. 88 Telefon 0951/31299